UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1970 • Thèse n° 601

Étude de l'activité levuricide du Leucocyanidol en présence de Cuivre

Thèse pour le Doctorat de l'Université

Mention Pharmacie

présentée et soutenue publiquement

le Vendredi 22 Mai 1970

par Jacques Marcel DUMAS

Bachelier ès Sciences (Pharmacie)

(Université Laval, Québec)

Licencié en Pharmacie

né le 16 Janvier 1942 à VICTORIAVILLE (Québec)

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

MM. J. MASQUELIER, Professeur . . . . . Président

J. CANELLAS, Professeur . . . . . } Juges

V. DARGELOS, Agrégé . . . . . }

R. BAUTE, Agrégé . . . . . }

Éditions Bergeret, 2, rue Bergeret - BORDEAUX
— Tél: 91-12-59 —

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543911_0030

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOYENS HONORAIRES : MM. G. PORTMANN, R. SIGALAS, F. TAYEAU.
DOYEN : M. H. BRICAUD. — **ASSESSEURS** : MM. J. MASQUELIER, J. RIVIÈRE, Cl. BERAUD.

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. CHARRIER, DUBREUIL, CREYX, DARGET, R. SIGALAS, G. PORTMANN, M. RIVIÈRE, R. GIRARD, C. PIFFAULT, R. FABRE, R. DUFOUR, P. FOURMENT, E. AUBERTIN, X. J. DUBECQ, L. MASSÉ, A. LACHAPÈLE, G. VITTE, J. DESPONS, G. DUBOURG, P. DELMAS-MARSALET.

MAITRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ HONORAIRE : M. BERGER.

PROFESSEURS TITULAIRES

MM.	
P. DERVILLÉE	Médecine légale et Médecine du travail.
R. MANDOUL	Zoologie et parasitologie.
R. CASTAGNOU	Toxicologie et hygiène appliquée.
J. REBOUL	Carcinologie.
P. MESNARD	Chimie organique et Chimie analytique.
R. GRANDPIERRE	Physiologie.
P. BROUSTET	Clinique médicale cardiologique.
N.	Clinique chirurgicale.
F. TAYEAU	Biochimie médicale A.
G. MAYER	Histologie et embryologie.
P. BLANQUET	Physique nucléaire appliquée et radiobiologie.
R. SARIC	Clinique médicale.
L. POUYANNE	Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique.
J.-J. DUBARRY	Hydro-climatologie thérapeutique et clinique des maladies de l'appareil digestif.
F.-J. TRAISSAC	Clinique thérapeutique.
R. MAHON	Clinique d'accouchements.
R. PAUTRIZEL	Immunologie et biologie parasitaire.
Mlle G. ROUGIER	Biologie appliquée à l'éducation physique et aux sports.
G. MOUSTARDIER	Bactériologie.
E. BESSIÈRE	Clinique ophtalmologique.
H. LEGER	Anatomie pathologique.
J. MASQUELIER	Matière médicale.
G. MORETTI	Clinique médicale propédeutique et médecine tropicale.
N.	Clinique oto-rhino-laryngologique.
P. LAUMONIER	Clinique chirurgicale pleuro-pulmonaire.
J. LENG-LÉVY	Clinique médicale et des maladies infectieuses.
R. LETAC	Pathologie et recherche chirurgicales.
R. QUILICHINI	Pharmacie galénique.
E. NEUZIL	Biochimie médicale B.
R. STOLL	Biologie.
J. LANGE	Clinique urologique.
P. FRÉOUR	Hygiène et Clinique de pneumophtisiologie.
F. RIGAUD	Anatomie.
J. FAURE	Médecine expérimentale et physiopathologie.
N.	Clinique chirurgicale des maladies cardiaques.
J. VILLAR	Clinique gynécologique.
P. LE COULANT	Clinique des maladies cutanées et syphilitiques.
M. BERGOUIGNAN	Clinique neurologique.
J. DUHAMEL	Physique médicale et pharmaceutique.
R. BABIN	Pharmacie chimique.
H. CHOUSSAT	Pathologie médicale.
L. CHASTRUSSE	Clinique obstétricale.
P. VERGER	Clinique médicale des maladies des enfants.
F. LAPORTE	Chirurgie générale.
R. TINGAUD	Clinique chirurgicale.
H. LAUBIE	Botanique et cryptogamie.
Cl. RICHIR	Anatomie pathologique.
R. GOLSE	Chimie générale et Chimie minérale.
J. BAILENGER	Zoologie et biologie animale.
J.-Cl. COLLETER	Chimie analytique.
H. BRICAUD	Médecine générale.
P. BENOIT	Clinique odonto-stomatologique.
Cl. MARTIN-DUPONT	Clinique néphrologique
J. CANELLAS	Pharmacodynamie et hydrologie.
R. CANIVENC	Histologie.
G. DELORME	Electroradiologie.
J. DEPAULIS	Séméiologie chirurgicale.
J. RIVIÈRE	Séméiologie médicale.
H. DULONG DE ROSNAY	Bactériologie.
R. CROCKETT	Chimie organique et chimie analytique.
R. DARMAILLACQ	Chirurgie générale.
H. POUYANNE	Clinique neuro-chirurgicale.
R. CASTAING	Réanimation respiratoire et anesthésiologie.

PROFESSEUR ASSOCIÉ

M.	
A. BAGHDIANTZ	Physique et chimie (Pharmacie).

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM.	
J. DAVID-CHAUSSÉ	Médecine générale.
J. MARQUEVIELLE	Biochimie médicale.
M. BLANC	Neuro-psychiatrie.
Cl. MASSÉ	Chirurgie générale.
R. MARAUD	Histologie et embryologie.
P. DU PASQUIER	Bactériologie.
J. STAEFFEN	Médecine générale.
J.-P. DUBECQ	Obstétrique.
G. NEVERRE	Physiologie.
J. MEUNIER	Histologie.
A. SERISÉ	Hygiène.
P. FERRET-BOUIN	Physique médicale.
J. VIDEAU	Anatomie.
P. BLANCHOT	Médecine générale.
L. DOUTRE	Chirurgie générale.
P. LOISEAU	Neuro-psychiatrie.
Cl. VRIGNAUD	Physique pharmaceutique.
P. SOURREIL	Dermato-vénéréologie.

MAITRES DE CONFERENCES AGRÉGÉS :

MM.	
R. JENSEN	Chimie biologique.
J. BROUSSIN	Electroradiologie.
R. TESSIER	Pneumo-phtisiologie.
Mme J. SÉCHET	Biochimie médicale.
C. LAGARDE	Carcinologie.
C. BÉRAUD	Thérapeutique.
H. LAZARINI	Médecine légale et Médecine du travail.
J. SOUMIREU-MOURAT	Obstétrique.
G. CABANIEU	Médecine générale.
R. LE LOURD	Pneumo-phtisiologie.
L. COURAUD	Chirurgie générale.
J. BENTÉGEAT	Hématologie.
L. ARNÉ	Médecine générale et thérapeutique.
Cl. MARTIN	Pédiatrie.
R. BAUTE	Cryptogamie.
V. DARGELOS	Microbiologie.
Mlle S. LARCEBAU	Toxicologie.
C. WONÉ	Médecine générale et thérapeutique.
J. JULIEN	Médecine générale et thérapeutique.
J.-J. BATTIN	Pédiatrie.
M. DALLOCCHIO	Cardiologie et maladies vasculaires.
J. AUBERTIN	Maladies infectieuses.
P. VÉRIN	Ophtalmologie.
M. GOT	Neuro-chirurgie.
J. TAVERNIER	Electroradiologie : diagnostic et thérapeutique.
J. VINCENT	Physiologie et explorations fonctionnelles.
L. CHEVAIS	Anesthésiologie.
G. GILLARDEAU	Anesthésiologie.
J. HONTON	Orthopédie et traumatologie.
M. BOMBART	Orthopédie et traumatologie.
A. HUGUES	Cancérologie.
M. SABATHIÉ	Anesthésiologie.

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

MM.	
M. PORTMANN	Oto-rhino-laryngologie.
F. BALLANGER	Urologie.
P. BIRBIS	Chirurgie générale.
J.-P. CALAMEL	Chirurgie générale.
L. TEXIER	Dermato-syphiligraphie.
R. GENESTE	Orthopédie.
F. FONTAN	Chirurgie générale.
J. LASSERRE	Orthopédie.

AGRÉGÉS LIBRES

MM.	
G. FAUGÈRE	Obstétrique.
M. L'ÉPÉE	Médecine légale.
H. CABANIÉ	Anatomie.
L. CORCELLE	Ophtalmologie.

CHARGÉS DES FONCTIONS DE MAITRE DE CONFÉRENCES :

MM.	
P. BONJEAN	Anatomie.
M. LAHOURCADE	Parasitologie.
M. SENTENAC	Anatomie.
G. DELMON	Anatomie pathologique.
J. TRIBOULEY	Immunologie, sérologie.
F.-X. MICHELET	Stomatologie.
E. JOUZIER	Chimie biologique (Pharmacie).
L. PINSON	Oto-rhino-laryngologie.
F. COHADON	Neuro-chirurgie.
J.-Cl. ROQUES	Physique médicale.
P. ESCHAPASSE	Physique médicale.
J. PACCALIN	Médecine générale et thérapeutique.

Le Conseiller administratif, Chef des services administratifs
André ARGILAS.

L'Attaché d'administration universitaire, Directeur du cabinet :
Madame M. C. CHAPENOIRE.

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation, ni improbation.

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1970 • Thèse n° 601

Étude de l'activité levuricide du Leucocyanidol en présence de Cuivre

Thèse pour le Doctorat de l'Université

Mention Pharmacie

présentée et soutenue publiquement

le Vendredi 22 Mai 1970

par Jacques Marcel DUMAS

Bachelier ès Sciences (Pharmacie)

(Université Laval, Québec)

Licencié en Pharmacie

né le 16 Janvier 1942 à VICTORIAVILLE (Québec)

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

MM. J. MASQUELIER, Professeur . . . . . Président

J. CANELLAS, Professeur . . . . . }

V. DARGELOS, Agrégé . . . . . } Juges

R. BAUTE, Agrégé . . . . . }

Éditions Bergeret, 2, rue Bergeret - BORDEAUX
— Tél: 91-12-59 —

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

ETUDE DE L'ACTIVITE LEVURICIDE

DU LEUCOCYANIDOL

EN PRESENCE DE CUIVRE

AVANT - PROPOS

°°°

Il nous est particulièrement agréable au début de ce travail de remercier tous ceux qui nous ont aidé à le réaliser . En particulier :

- Monsieur le Professeur MASQUELIER, Assesseur du Doyen, Directeur de l'U. E. R. des Sciences Pharmaceutiques de Bordeaux, qui nous a confié le sujet de notre thèse et nous a complaisamment accueilli dans son laboratoire . Tout au long de ce travail, il a su intervenir avec tact et beaucoup de science chaque fois que le besoin s'en fit sentir . Nous ne saurions trouver les mots pour lui exprimer toute notre reconnaissance .

- Monsieur le Professeur CANELLAS, que nous remercions vivement pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de siéger parmi nos juges .

- Monsieur le Professeur Agrégé DARGELOS, auquel nous sommes très reconnaissant pour la bienveillance avec laquelle il a accepté de faire partie de notre jury de thèse .

- Monsieur le Professeur Agrégé BAUTE, dont nous apprécions l'accueil aimable, ainsi que l'intérêt qu'il a porté à notre travail en acceptant de le juger .

- Monsieur le Professeur Agrégé ROQUEBERT, qui a bien voulu accepter de siéger au comité de lecture. Nous l'assurons de toute notre gratitude .

- Monsieur J. MICHAUD , Maître-Assistant au Laboratoire de Matière Médicale, dont nous avons pu apprécier quotidiennement les judicieux conseils, et qui nous a généreusement procuré le leucocyanidol nécessaire à nos recherches .

- Mademoiselle M. F. LESCA, Assistante, qui nous a toujours aidé avec bienveillance .

- Mademoiselle J. TRIAUD , qui nous a accueilli avec gentillesse et n'a cessé de nous apporter son aide durant tout ce travail .

En témoignage de reconnaissance à mes Parents et à ma Femme .

Nos recherches ont grandement bénéficié de la subvention accordée au Laboratoire de Matière Médicale par le Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux . Que le C. I. V. B. trouve ici l'expression de notre profonde gratitude .

INTRODUCTION

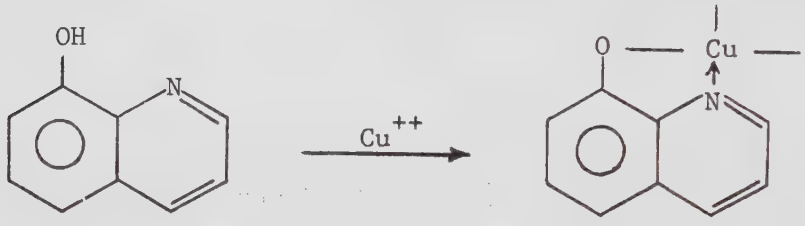
°°°

Plusieurs ions de métaux lourds sont indispensables à la croissance microbienne . Ils s'incorporent en particulier aux enzymes où ils deviennent essentiels à l'action catalytique . Leur présence n'est cependant requise qu'en petite quantité . On les appelle pour cette raison oligo-éléments .

Une fois les sites physiologiques saturés, ils deviennent toxiques en réagissant, par exemple, au niveau des groupements sulfhydryles (212) . De telles propriétés sont mises à profit dans de nombreuses préparations fongicides . C'est le cas de la "bouillie bordelaise" où les ions cuivriques sont responsables de l'activité antibiotique . De nombreux travaux ont cependant démontré que plusieurs microorganismes, et en particulier les levures, élaborent des systèmes leur permettant de résister à des doses de plus en plus fortes de ces métaux (5-9) (140-142) (250) .

En camouflant l'ion métallique sous la forme d'un complexe organique, il semble néanmoins possible de déjouer ces mécanismes de défense . C'est le cas du chélate cuivrique de la 8-hydroxyquinoline . A la concentration de 1 ppm , le complexe inhibe totalement les cultures fongiques . Il s'agit d'un cas très net de synergie puisque ni la molécule organique ni le métal ne manifestent la moindre activité à de telles dilutions (240) .

De nombreux autres composés doivent, semble-t-il, leurs propriétés antibiotiques à leur aptitude à séquestrer les ions métalliques . Tels sont les thiosemicarbazones (22, 86), l'isoniazide (298), l'acide para - aminosalicylique (50), l'acide kojique (78), les dérivés de la phénanthroline (253) et la plupart des antibiotiques d'origine fongique (286-290) .



8-Hydroxyquinoline *Chélate 1 : 1*

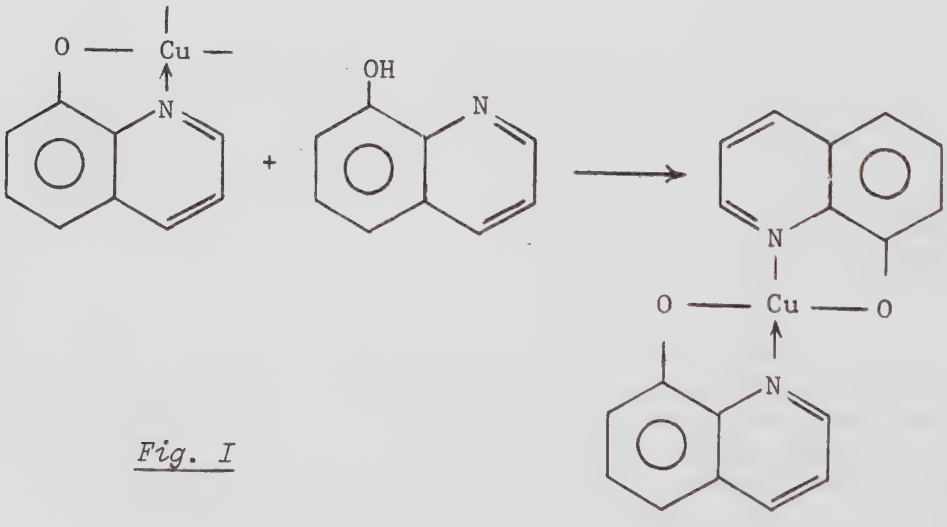


Fig. I

Chélate 2 : 1

Les récents résultats obtenus par MASQUELIER (184) avec le chélate cuivrique du quercétol nous ont incité à poursuivre ces investigations sur différents polyphénols d'origine végétale . Le leucocyanidol nous ayant donné des résultats particulièrement intéressants sur la levure Candida albicans , c'est sur lui que nous avons concentré nos recherches afin d'élucider le mécanisme d'action de son mélange avec le cuivre . Ce choix nous a paru valable du point de vue pratique, étant donné d'une part, l'inquiétante recrudescence des candidoses depuis l'introduction des antibiotiques en thérapeutique, et, d'autre part, l'excellente disponibilité du leucocyanidol dans le monde végétal (14) .

PREMIERE PARTIE

GENERALITES

CHAPITRE I
LES CANDIDOSES

°°°

A_/ LE RENOUVEAU DES INFECTIONS FONGIQUES. ROLE DE LA THERAPEUTIQUE MODERNE .

1°- Introduction .

Candida albicans est une levure saprophyte des muqueuses de l'homme, présente en faible quantité chez bon nombre d'individus . Selon MARPLESS et Di MENNA (170), le pourcentage de porteurs sains rapporté généralement dans la littérature (de 7,5 à 30 p 100) est bien inférieur à la réalité . L'écart serait dû aux modes de prélèvement . Se servant d'écouvillons, ils isolent la levure de la cavité buccale de 18,3 p 100 d'individus sains. Par lavages buccaux, ils obtiennent des prélèvements positifs chez 50,5 p 100 des adultes et 33,5 p 100 des enfants examinés . En 1949-50, YOUNG, KRASNER et YUDKOFSKY (302) rapportent 48,6 p 100 de cultures positives pour C. albicans , obtenues de la salive de 584 jeunes adultes en excellente santé . De ce nombre, 9,7 p 100 seulement comptent plus de mille levures par ml . Durant l' année universitaire 1954-55, ils isolent la même levure chez 62,1 p 100 de 111 étudiants, dont 47,8 p 100 (53 individus) comptent plus de mille levures par millilitre de salive . Les auteurs attribuent cette augmentation de porteurs sains à l'usage de plus en plus répandu des antibiotiques à cette époque .

Dans certains états (grossesse, période néonatale, athrepsie, cachexie, vieillesse), diverses maladies (diabète, leucémie) et sous l'influence de différentes thérapeutiques, il arrive souvent qu'il prolifère avec ou sans manifestations pathologiques : muguet, dysphagie, troubles digestifs et intestinaux, vulvo-vaginite et autres. Dans les cas extrêmes, il peut envahir le système circulatoire et se fixer au niveau des viscères, entraînant une issue fatale (244) .

Cette pathogénie semble principalement due à l'endotoxine isolée de la paroi par ISENBERG (129) et obtenue d'autre part par désintégration sonique (205) . MAIBACH et KLIGMAN (165) lui attribuent les candidoses cutanées qu'ils ont réussi à provoquer chez des volontaires . L'individu normal possède un système de défense lui permettant de lutter efficacement contre les levures potentiellement pathogènes qu'il héberge . Si cependant , ses réactions immunologiques sont altérées ou si les Candida albicans prolifèrent au-delà d'un certain seuil relatif à ses capacités immunologiques, les endotoxines libérées par les cellules mortes en se décomposant deviennent la cause des accidents bien connus des candidoses .

Il peut arriver cependant que ce ne soit plus en tant qu'agent toxique, mais en tant que "présence allergisante" que C. albicans déroute le clinicien . Il provoque alors asthme, œdème de Quincke, urticaire, migraine, conjonctivite, troubles digestifs que l'on traite le plus souvent de façon symptomatique pendant de longues périodes (27, 31, 154) .

2°- Antibiothérapie .

En période pré-antibiotique, les accidents à Candida étaient relativement rares . L'introduction en thérapeutique des sulfamides, de la pénicilline et surtout des antibiotiques à large spectre a provoqué une augmentation notable des infections fongiques, et plus particulièrement des candidoses (246) .

Le zèle n'a certes pas manqué . Les publications sont nombreuses . On accuse tour à tour les sulfamidés (34, 292), la pénicilline (16, 52, 85, 303), la chlortétracycline (18, 99), le chloramphénicol (99), l'oxytétracycline (15), la néomycine (163) et autres .

Dès 1951, le rôle des antibiotiques paraît à ce point fondé que l'American Council of Pharmacy préconise que les dangers de surinfections à levures encourus par l'usage des antibiotiques soient inscrits sur les notices accompagnant les emballages de tétracycline, d'oxytétracycline et de chloramphénicol (264) . Nous rapportons dans le tableau I quelques exemples caractéristiques de l'augmentation du nombre de Candida albicans provoquée par l'administration de divers antibiotiques .

Tous ces auteurs sont d'accord pour noter qu'il y a non seulement augmentation du nombre d'individus chez lesquels on réussit à isoler des levures (c e s personnes devaient en contenir trop peu avant la thérapeutique pour donner des prélèvements positifs par les méthodes usuelles), mais surtout un accroissement souvent considérable du nombre de Candida chez les individus qui en hébergeaient déjà .

De cette augmentation, il ne s'ensuit pas nécessairement des infections caractérisées, la concentration en levures pouvant demeurer en deçà du seuil immunologique . Considérant l'usage très répandu des antibiotiques, GRACIANSKY et DELAPORTE (92), dans une revue très exhaustive de la question, affirment "qu'il est certain que la fréquence des accidents qu'il est indiscutablement légitime de rapporter aux levures n'est pas considérable" . Selon Mc GOVERN et coll. (198), le danger n'existe que si la thérapeutique est poursuivie pendant plusieurs jours .

Les antibiotiques d'origine fongique et les sulfamidés ne sont malheureusement pas les seuls en cause . Récemment, ALTERAS et coll. (2) observent 65 cas (18, 5 p 100) de candidoses survenues à la suite de traitements par le métronidazole . Dans chaque cas, ils isolent

TABLEAU I

EFFETS DES ANTIBIOTIQUES SUR LA PROLIFERATION DE CANDIDA ALBICANS CHEZ L'HOMME.

Références	Antibiotiques	Nombre de cas (prélèvements)	Prélèvements positifs	
			Avant l'antibiothérapie	Après l'antibiothérapie
LIPNIK (156)	Aucun té (témoins)	67	5	-
	Pénicilline	42	-	5
	Auréomycine ou Chloromycétine	63	-	40
McGOVERN (198)	Auréomycine	21 (bouche)	5	6
		21 (rectum)	3	5
	Chloromycétine	15 (bouche)	2	4
		15 (rectum)	1	3
	Chloromycétine I.M.	9 (bouche)	1	4
SHARP (252)	Terramycine	57 (gorge)	13	27
		28 (crachat)	14	22
		85 (rectum)	0	52
	Sulfadiazine	46 (gorge)	14	18
		33 (crachat)	20	22
		69 (rectum)	2	14
LOH (159)	Auréomycine	17 (selles)	6	9
	Terramycine	3 (selles)	1	3

Candida albicans en abondance . L'efficacité du traitement spécifique (nystatine) ne laisse aucun doute sur l'agent responsable de la maladie . Les auteurs attribuent ces surinfections à l'irritation des muqueuses et à la perturbation de la flore locale .

3°- Hormonothérapie .

a) Corticostéroïdes .

Injectés par voie sous-cutanée, deux heures avant puis deux heures après une injection intra-péritonéale de Candida albicans , 2, 5 mg de cortisone provoquent la mort de 21 souris sur 22 dans les deux semaines qui suivent . Les souris témoins ne recevant que les levures survivent très bien à l'infection . A l'autopsie, l' on trouve de nombreux abcès dans presque tous les viscères, en particulier les reins (19 des 21 souris mortes) (249).

Après s'être aperçus qu'une seule dose d'hydro-cortisone (de 1 à 10 mg) n'avait aucun effet sur le taux de mortalité de souris préalablement infestées par C. albicans , HENRY et FAHLBERG (109) constatent que de faibles doses administrées quotidiennement pendant deux semaines augmentent de façon significative le nombre de décès . Dans les mêmes conditions, la tétracycline produit des effets similaires . L'administration concomitante de l'antibiotique et du corticoïde intensifie la gravité de l'infection . Les auteurs en concluent que les deux drogues agissent probablement de façons différentes sur la réaction de l'animal à l'infection .

Les résultats expérimentaux ont malheureusement été confirmés en clinique, notamment par LEVY et COHEN (152) à la suite d'un traitement prolongé à la corticotrophine, puis, plus récemment par BOYD et CHAPPELL (30) avec l'hydro-cortisone par voie veineuse.

Il est reconnu que les corticostéroïdes abaissent les réactions de défense aux infections en inhibant

le système réticulo-endothélial et en réduisant la disponibilité des phagocytes . Il est donc possible, comme le suggèrent LEVY et COHEN (152) que ce soit de cette façon qu'ils augmentent la fréquence et la sévérité des candidoses .

b) Contraceptifs .

Partant du fait que la grossesse favorise la multiplication vaginale des levures et que les contraceptifs induisent un état de pseudo-grossesse, il était possible de prévoir que leur usage allait entraîner une augmentation des candidoses. PORTER et LYLE (224) en rapportent onze cas, et chaque fois, la thérapeutique s'avère difficile . Chez trois de ces malades, l'arrêt des prophylactiques s'impose et chez plusieurs autres, deux à trois périodes de 40 jours de traitements intensifs à la nystatine parviennent difficilement à rétablir une situation normale .

B/ MECANISMES PAR LESQUELS LES ANTIBIOTIQUES AUGMENTENT LES INFECTIONS FONGIQUES .

1°- Action directe .

Comme le souligne fort à propos NOVAK (209), les résultats à ce sujet sont très contradictoires . Après avoir fait une revue de la littérature, il dresse un bilan sous forme de tableau (tableau II) .

TABLEAU II

NOMBRE DE PUBLICATIONS SUR LES EFFETS "IN VITRO" ET "IN VIVO" DES ANTIBIOTIQUES SUR CANDIDA ALBICANS

Antibiotiques	"in vitro"			"in vivo"		
	+	0	-	+	0	-
Chlortétracycline	11	10	7	8	1	1
Oxytétracycline	4	5	0	4	0	1
Tétracycline	1	2	1	5	0	0
Pénicilline	6	9	1	2	1	0
Streptomycine	4	5	0	1	1	0
Chloramphénicol	1	7	0	2	1	0
Erythromycine	2	2	0	-	-	-
Néomycine	2	2	0	1	0	0
Bacitracine	2	3	0	-	-	-
Isoniazide	0	1	0	2	0	0

+ = stimulation
0 = indifférence
- = inhibition

L'auteur hongrois est d'accord avec MANDEL, HOOD et COHEN (167) pour affirmer que les discordances observées sont, en général, dues à des erreurs techniques, résultant , en particulier, de l'usage de méthodes turbidimétriques avec des produits dont la coloration s'intensifie en solution (chlortétracycline) . Selon LIPNIK, KILGMAN et STRAUSS (156), la stimulation constatée avec l'Auréomycine(214) est essentiellement due au phosphate dibasique contenu dans la préparation commerciale de la capsule, le milieu utilisé (Sabouraud glucosé) étant déficient en sel .

Reprenant les mêmes expériences l'année suivante, HUPPERT et coll. (126, 127) prétendent que des préparations tout à fait pures de chlortétracycline, de néomycine et de bacitracine ont des effets stimulants certains sur la croissance de Candida albicans, les autres antibiotiques utilisés n'ayant aucun effet notable : pénicilline, streptomycine, chloramphénicol, oxytétracycline , érythromycine et magnamycine . Ils reconnaissent cependant que l'effet constaté "in vitro" ne constitue probablement pas le mécanisme biologique fondamental des surinfections diagnostiquées "in vivo" .

En France, MARCELOU et SEGRETAIN (171) emploient la pénicilline, la chlortétracycline et la streptomycine à deux concentrations différentes et à des températures de 20 et 37°C, en milieu synthétique avec ou sans facteurs de croissance et en Sabouraud glucosé . Les taux de croissance obtenus dépendent évidemment des milieux utilisés, mais après 48 heures, aucune influence des antibiotiques n'a pu être mise en évidence, ni sur le nombre, ni sur la morphologie des Candida . Confirmant ces résultats, MANDEL , HOOD et COHEN (167) échouent dans leur tentative pour produire des mutants dont la croissance serait stimulée par la chlortétracycline .

Les résultats publiés récemment sur les sulfamidés par ANSEL et THIBAUT (4) tendent à prouver que la plupart d'entre eux, la sulfaméthoxypyridazine à fortes doses et la sulfasuccithiazole exceptées, stimulent "in vitro" la multiplication de Cryptococcus neoformans et de Candida albicans .

2°- Action sur la flore .

L'on croit généralement que la flore normale qu'elle soit buccale, intestinale ou vaginale, possède une action freinatrice sur la croissance de certains germes potentiellement pathogènes, les empêchant ainsi d'atteindre des concentrations toxiques . En inhibant certaines bactéries, et par ricochet d'autres bactéries qui dépendent de facteurs de croissance secrétés par les premières, les antibiotiques brisent l'équilibre naturel au profit de ces microorganismes .

Considérant tout d'abord l'action de différentes bactéries de la flore sur C. albicans , nous verrons, dans un second temps, les effets des antibiotiques sur cette même flore .

a) Actions de différentes bactéries sur la croissance de C. albicans .

Les résultats obtenus sont souvent opposés . Ces contradictions résultent le plus souvent de conditions expérimentales très différentes .

YOUNG, KRASNER et YUDKOFSKY (302) , GUILLOT (94) et KOSER et coll. (144) prétendent que les lactobacilles possèdent une action inhibitrice sur la croissance de C. albicans . Selon eux, en culture mixte, la croissance n'est pas supprimée, mais ralentie . YOUNG et coll. (302) attribuent cet effet à la sécrétion d'acide lactique . D'après GUILLOT , cependant, ce métabolite ne peut expliquer à lui seul le phénomène . Il isole à partir d'une culture de Lactobacillus acidophilus un facteur thermolabile qu'il rend responsable de l'inhibition .

Néanmoins, PAINE (213) puis ISENBERG et coll. (120) n'observent aucun effet anti-Candida . Bien au contraire, ISENBERG et coll. (130) constatent une stimulation allant de 137 à 172 p 100 avec L. acidophilus et de 148 à 163 p 100 avec L. bifidus . Les expériences effectuées "in vivo" par MASQUELIER et BEUSTES (24, 186)

présentent par ce fait un intérêt tout particulier . Provoquant des candidoses intestinales chez des cobayes par administration orale d'antibiotiques, les auteurs ne réussissent pas à empêcher la multiplication des levures par ingestion concomitante de fortes concentrations de L. acidophilus , même si, par ailleurs, les lactobacilles maintiennent un chimisme intestinal normal et sain . A la suite de cette observation, MASQUELIER (180, 181) recommande une association antifongique-ferments lactiques pour lutter efficacement contre tout dysmicrobisme pouvant être causé par les antibiotiques .

Les observations cliniques de DEBRE et coll. (55) confirment ces résultats . Après usage d'antibiotiques chez des nourrissons, ils observent une prolifération de Candida albicans même dans les selles contenant une forte proportion de Lactobacillus bifidus .

De tous les antagonismes, celui signalé par GALE et SANDOVAL (83) est sans doute le plus prononcé. Partant d'une infusion cœur-cervelle contenant 1×10^5 cellules de C. albicans et 1×10^7 cellules vivantes d'E. coli par ml, ils ne retrouvent après 5 puis 24 heures que 1000 puis 100 levures vivantes par ml. Toutefois, PAINE (213), KLITE et GALE (143) et surtout ISENBERG et coll. (130), ces derniers utilisant jusqu'à 23 souches différentes , ne parviennent à déceler chez le colibacille que peu (213) ou pas d'action candidicide (130, 143) .

Utilisant des disques de papier imprégnés du surnageant d'une culture de Pseudomonas aeruginosa, KLITE et GALE (143) s'aperçoivent, par un examen attentif à la loupe après 48 heures, que les colonies de Candida albicans près du disque sont très petites et que leur taille augmente au fur et à mesure de leur éloignement . Ils en déduisent qu'un métabolite de la bactérie , en diffusant lentement, inhibe la croissance de la levure.

Les études les plus intéressantes sur les inter-relations entre la flore bactérienne et la levure que nous étudions nous semblent être celles d' ISENBERG et coll (130) . Ces auteurs ont mis au point un appareillage

simple et astucieux . Ils introduisent dans un tube en verre de 13 x 150 mm un tube à dialyse fermé à sa partie inférieure par un double nœud et suspendu à sa partie supérieure au couvercle . La bactérie est ensemencée dans le tube central et la levure, dans le tube principal . Les cultures se font en aérobiose, en microaérobiose et en anaérobiose . Elles sont simultanées, les deux organismes étant ensemencés en même temps, ou successives , la bactérie étant d'abord ensemencée , puis après 18 heures d'incubation, le tube à dialyse contenant la bactérie est enlevé et la levure est ajoutée au tube principal . Vingt-quatre heures plus tard, la croissance est déterminée par turbidimétrie .

Les effets obtenus avec une même bactérie varient suivant la tension en oxygène et le mode de culture . En cultures simultanées, la croissance de C. albicans est toujours maximum en microaérobiose . En cultures successives, elle est supérieure en aérobiose . Les microorganismes inhibiteurs en cultures simultanées le demeurent en cultures successives tandis que les bactéries stimulantes voient leur effet augmenter si elles sont ensemencées avant la levure .

Quelles que soient les conditions de cultures, certains organismes demeurent toujours inhibiteurs . Ce sont Escherichia freundii, les Klebsiella, Proteus mirabilis, les Clostridium, Bacteroides varius et Bacteroides rettgeri . D'autres augmentent toujours le taux de levures : S. aureus, Alcaligenes faecalis, Bacteroides vulgatus, Lactobacillus bifidus et L. acidophilus .

Les effets stimulants, toujours supérieurs en cultures successives, allant jusqu'à 340 p 100 avec S. aureus, ne peuvent se comprendre que par un apport de métabolites possédant des propriétés excitantes pour la levure . D'autre part, les effets inhibiteurs peuvent difficilement s'expliquer par une compétition pour les substrats ou les facteurs de croissance . S'il en était ainsi, les différences de croissance entre les deux types de culture devraient être bien supérieures à celles observées. Devant

ces faits, les auteurs suggèrent que le métabolisme propre à chaque bactérie soit le facteur déterminant sur sa coexistante avec la levure . Le rôle des conditions atmosphériques s'explique de même par l'accumulation de métabolites plus ou moins oxydés, c'est-à-dire, de produits plus ou moins aptes à servir de substrats à la levure .

Les résultats obtenus par PAINE (213) s'accordent assez bien avec les précédents . Considérant le pH et la compétition pour les facteurs de croissance comme n'étant pas des éléments déterminants, l'auteur fait remarquer que les bactéries inhibitrices sont en général celles qui produisent et maintiennent un potentiel redox négatif . Les espèces de Candida utilisées, C. tropicalis et C. krusei , sont d'ailleurs inhibées en milieu réducteur . Mais ce fait ne peut à lui seul expliquer les inhibitions très marquées provoquées par Proteus morganii , Proteus vulgaris et Aerobacter aerogenes . L'auteur les attribue à la formation de substances anti-Candida qui peuvent aller de métabolites aussi simples que l'acide lactique à des produits de structures complexes .

b) Effets des antibiotiques sur la flore

Selon WOODS, MANNING et PATTERSON (300) , les antibiotiques augmentent les infections fongiques en supprimant la flore locale, abandonnant ainsi les substrats disponibles et les facteurs de croissance aux levures . Il ne semble pas cependant qu'il en soit ainsi . Certes, les effets varient suivant les antibiotiques utilisés, mais dans l'ensemble, ils seraient plus qualitatifs que quantitatifs .

En premier lieu, disparaissent les bactéries sensibles, puis les espèces résistantes qui exigent des facteurs de croissance sécrétés par les premières . Ces germes sont peu à peu remplacés par des bactéries indifférentes et des souches que l'usage intempestif des antibiotiques depuis plus de vingt ans a rendu résistantes . Déjà LOH et BAKER en 1955 (159) étudiant les effets de la chlortétracycline et de l'oxytétracycline sur la flore

intestinale de l'homme, en étaient arrivés aux mêmes conclusions . De cette étude portant sur vingt cas, deux faits qui corroborent les essais "in vitro" d'ISENBERG et coll. (130) , de PAINE (213) et de KLITE et GALE (143) sont à signaler :

- dans le seul cas où il y a prolifération de P. aeruginosa, la concentration de C. albicans demeure à son taux initial (143) .

- dans 10 cas, il y a apparition ou prolifération de Proteus , dans 11 cas, il y a augmentation ou apparition de C. albicans . Cependant, il n'y a que trois cas où Proteus et C. albicans prolifèrent en même temps .

Il est à noter enfin que la seule complication thérapeutique, une uréthrite , a été causée par Proteus mirabilis .

Il semble donc que les antibiotiques, en brisant l'équilibre préexistant, font apparaître des métabolites favorables à certains microorganismes normalement présents en faible quantité .

Les résultats obtenus par CAMPBELL et HESELTINE (40) semblent pencher en cette faveur . Ces auteurs émulsionnent, dans du bouillon nutritif contenant 1 p 100 de tétracycline, des selles de souris ou de la salive humaine prélevée par écouvillon . Ils laissent en contact 24 heures, puis centrifugent ou stérilisent par filtration sur verre fritté . Le filtrat ou le surnageant, ajoutés à une culture de C. albicans , en augmentent la croissance . Parallèlement à cette stimulation, il y a apparition d'éléments mycéliens . Le rôle joué par les bactéries est capital : si l 'émulsion fécale ou salivaire est autoclavée avant l'incubation avec l'antibiotique, aucun effet ne s'ensuit . Si au contraire, l'antibiotique est omis, le surnageant ou le filtrat ne trouble en aucune façon la croissance de la levure . Bien plus, si une suspension fécale est ajoutée à une gélose nutritive et qu'on l'inocule par l a

suite avec C. albicans , le développement de la levure n'est nullement affecté . C'est là une autre preuve que la compétition pour les substrats n'entre pas en ligne de compte, pour ce cas-ci du moins .

Il semblerait donc que l'antibiotique sélectionne des souches produisant des métabolites excitant la multiplication de la levure . La production d'éléments mycéliens est aussi significative . Ceux-ci sont en effet considérés comme les formes envahissantes de Candida albicans et l'effet produit par le mélange tétracycline-selles ou tétracycline-salive peut être interprété comme un changement vers une forme à potentiel pathogène supérieur .

3°- Altération des mécanismes de défense .

L'effet des antibiotiques sur la flore bactérienne ne peut expliquer à lui seul tous les accidents à levures . Ainsi, l'injection intra-péritonéale d'un mélange contenant 1×10^8 cellules d'une souche avirulente de C. albicans et 2 mg de chlortétracycline produit la mort de seize souris sur dix-sept, l'administration séparée des deux produits n'ayant aucun effet nocif . Les levures isolées des souris mortes demeurent avirulentes . Lorsque le mélange antibiotique-levure est centrifugé, l'injection séparée du surnageant et du culot lavé ne provoque aucun effet léthal . Il n'y a donc pas action directe sur la levure . Il faut donc conclure que l'antibiotique agit sur l'hôte en abaissant probablement ses mécanismes de défense (243) .

Dans l'expérience précédente, l'antibiotique et la levure étant administrés par la même voie, on peut objecter que l'antibiotique n'agit qu'en irritant les tissus de l'hôte . Cependant, ROTH et EYLER (236) puis De MELLO et KISER (56) ont montré que l'administration orale de tétracycline provoquait une augmentation notable du taux de mortalité des souris infestées par voie intra-péritonéale .

a) Observations de phénomènes de défense contre Candida albicans .

MOURAD et FRIEDMAN (206) réussissent à vacciner des souris par injections sous-cutanées répétées de cellules vivantes, tuées au merthiolate ou désintégrées par ultra-sons . Même si la protection obtenue n'est pas totale, il ne s'en établit pas moins un degré de résistance significatif . L'injection subséquente de 10.000 levures par voie veineuse produit la mort de 62 p 100 des témoins, de 43 p 100 des animaux traités par des suspensions de cellules vivantes, de 36 p 100 des souris vaccinées par les levures tuées au merthiolate et de 17 p 100 de celles ayant reçu les cellules détruites par les ultra-sons . Il est intéressant de noter que ce procédé, reconnu pour libérer l'endotoxine (205), est aussi celui qui produit la meilleure protection .

HANSECLEVER et MITCHELL (97) n'obtiennent aucun effet avec des suspensions de cellules tuées par la chaleur, mais une protection supérieure à celle obtenue précédemment (206) par injections de cellules vivantes (34 p 100 de mortalité chez les souris vaccinées, 97 p 100 chez les témoins) . Les rayons X détruisent toute l'immunité acquise . Ils augmentent d'ailleurs la susceptibilité des souris non vaccinées (91) .

MAIBACH et KLIGMAN (165) provoquant des candidoses cutanées chez des volontaires, constatent que la quantité de levures capables de provoquer l'infection varie avec chaque individu, mais qu'elle est, en général, très élevée . Un million et demi de germes sont nécessaires pour atteindre 100 p 100 des volontaires, la moitié de cette dose donnant des résultats positifs chez 50 p 100 des individus . Ils constatent qu'une dose apte à provoquer une réaction amène toujours une réaction inflammatoire bien nette avec plusieurs pustules . Malgré plusieurs essais, ils ne peuvent obtenir de réponses intermédiaires avec des doses inférieures .

Ces faits expérimentaux sont en accord avec les observations cliniques : les individus qui hébergent des Candida albicans , parfois en quantités considérables, ne souffrent pas nécessairement de candidoses . C'est donc dire que la résistance naturelle de l'homme à cette levure est élevée .

En 1964 , LOURIA et BRAYTON (161) isolent du sang d'individus sains un facteur léthal spécifique pour Candida albicans et sa variété pathogène C. stellatoidea . Il est inactif sur les autres espèces de Candida , Cryptococcus neoformans et Saccharomyces cerevisiae . Diverses études chimiques permettent de déceler sa nature peptidique . En électrophorèse, il migre avec les fractions α et β des globulines . Présent dans le sérum des 20 adultes et des 11 enfants normaux soumis à l'expérience, on ne le retrouve que chez 20 des 24 adultes de plus de 50 ans . Les taux sériques sont réduits dans les cas de cirrhose, d'hépatite, d'azotémie diabétique et non diabétique, de candidose généralisée . Les concentrations peu élevées de la période néo-natale expliquent sans doute la fréquence du muguet chez les nouveau-nés, possiblement contaminés "in utero" ou lors du passage vaginal (145, 260) .

Les récentes observations cliniques de VIC-DUPONT , COULAUD et DELRIEU (283) à la Clinique des Maladies Infectieuses de l'Hôpital Claude Bernard s'accordent, on ne peut mieux, avec ces faits expérimentaux . Ils observent trente cas de septicémies à "Candida" chez des patients porteurs d'un cathéter intra-veineux . Dans 27 de ces cas, il s'agit de Candida albicans. Selon eux, les levures vivant sur la peau envahissent l'orifice de pénétration cutanée du cathéter et se développent le long de celui-ci pour atteindre ensuite la circulation . Le simple retrait du cathéter a permis d'obtenir rapidement des hémocultures négatives en moins de trois jours chez vingt des trente malades . C'est donc dire que le sérum humain est parfaitement capable de lutter contre l'invasion des Candida . Les auteurs affirment n'avoir eu des difficultés que chez les patients dont les mécanismes de défense étaient gravement atteints .

b) Altération de ces phénomènes par les antibiotiques .

En 1950 , MUNOZ et GEISTER (207) constatent que la chlortétracycline inhibe "in vitro" la phagocytose de S. aureus par des leucocytes humains normaux , l'inhibition étant proportionnelle à la concentration en antibiotique . Ils observent une interférence marquée à des concentrations inférieures aux taux sanguins obtenus aux doses thérapeutiques habituelles . Nous savons, d'autre part (160), que ces mêmes leucocytes peuvent très bien digérer les formes levures de Candida albicans . Il se pourrait donc que cette action secondaire soit l'un des mécanismes responsables des surinfections à levures .

Des résultats très intéressants sont obtenus par GORCZYCA et Mc CARTY (90) en observant les effets produits par l'administration prolongée de faibles doses de pénicilline ou d'oxytétracycline sur les taux de protéines sériques de chèvres, et les changements produits par l'insufflation nasale subséquente de C. albicans . La pénicilline amène une baisse en albumines et une augmentation relative des globulines . L'administration subséquente de la levure produit un effet d'addition, c'est-à-dire une baisse supplémentaire en albumines et une hausse des γ-globulines et des protéines totales . Les levures seules diminuent le taux d'albumines et augmentent celui des globulines . L'oxytétracycline, au contraire, produit une hausse en albumines et en β-2 globulines et une baisse des autres globulines ; après insufflation de la levure, les globulines autres que les β-2 globulines n'augmentent pas autant que chez les animaux témoins ne recevant que la levure . C'est ce qui expliquerait, selon SEELIG (245), que les chèvres recevant l'oxytétracycline meurent dans une proportion de 80 p 100 alors que les animaux ne recevant que la levure ou la levure et la pénicilline survivent tous.

C_/ CONCLUSIONS .

En 1962 , MAIBACH et KLIGMAN (165) considérant l'immense effusion littéraire à propos des candidoses, se plaignent qu'on en soit resté, en général, à des considérations cliniques sommaires et que l'on ignore presque tout sur la dynamique de l'infection, les relations hôte-parasite , et même l'histo-pathologie . Plus récemment, VIC-DUPONT, COULAUD et DELRIEU (283) écrivent : "Le rôle des antibiotiques dans l'augmentation des infections à levures a été souligné dès 1950, mais le mécanisme de leur action n'est pas clairement établi" .

A l'heure actuelle, même s'il persiste beaucoup de mystère sur la genèse des candidoses, il nous est quand même permis de soutenir avec certitude que le dysmicrobisme créé par les antibiotiques et leur action inhibitrice sur les mécanismes de défense sont des facteurs favorisant la multiplication des levures potentiellement pathogènes .

La thérapeutique est, elle aussi, sous le signe de l'abondance, mais le nombre de médicaments dont l'efficacité ne peut être mise en doute semble assez restreint .

Ainsi, BROWNE (34) puis RIMBAUD et coll. (232) n'observent aucun effet des dérivés de la quinoléine en thérapeutique intestinale des candidoses . De même, MASQUELIER (180, 181) reconnaissant les effets bénéfiques des ferments lactiques dans la lutte contre le déséquilibre provoqué par les antibiotiques recommande qu'on leur associe un antifongique pour lutter efficacement contre l'augmentation possible du nombre de levures .

Les produits d'origine naturelle semblent les seuls vraiment efficaces (64, 65) , du moins en usage intestinal . Il arrive cependant de rencontrer des cas rebelles à leur action (36) . Il faut donc s'employer à rechercher de nouveaux produits dont la faible toxicité permette un usage intestinal ou local prolongé .

CHAPITRE II
LES LEUCOANTHOCYANNES

°°°

A/ DEFINITION .

On peut considérer comme leucoanthocyannes, l'ensemble des composés polyhydroxylés du flavanne qui se transforment en pigments anthocyanniques par chauffage en milieu acide (44). Cette conversion exige la présence sur le noyau flavannique, d'hydroxyles en 3 et 4 . La structure de base est donc le flavannediol - 3, 4 .

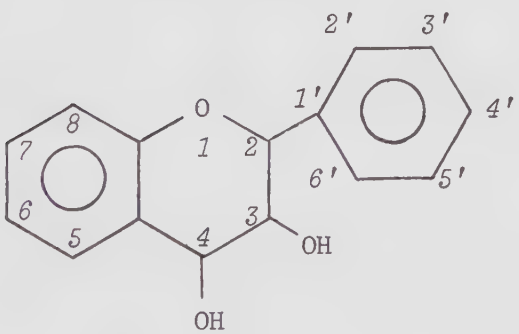


Fig. II - Flavannediol-3,4

Ces chromogènes figurent parmi les composés les plus répandus du règne végétal . Ils y constitueraient, selon BATE-SMITH (12), la majeure partie de la matière tannante . On les retrouve le plus souvent dans les tissus de revêtement (écorce, épicarpe, cuticule) et les tissus ligneux (266) . La plupart des fruits en contiennent . Ils y agissent sur la saveur, la couleur, la texture, la consistance .

En raison de leur forte astringence, les leuco-anthocyannes sont habituellement écartées de notre alimentation (13) ou, du moins, les fruits qui en contiennent ne sont consommés qu'à parfaite maturité, c'est-à-dire, au moment où leur degré de polymérisation supprime cette sensation désagréable (88) . Tels sont les pommes et les poires (296), les pêches, les prunes, les raisins, les bananes (269) .

Atténuée par l'addition de sucre, comme dans le chocolat (188), ou mieux encore, par un subtil mélange de diverses saveurs, comme c'est le cas chez les boissons fermentées, cette astringence peut apparaître comme très agréable au palais . Ainsi, certains vins rouges de la région bordelaise en renferment jusqu'à 4 g par litre (211, 230), les cidres de Normandie, de 300 à 500 mg (176) et les vins blancs secs de 10 à 90 mg (182, 194) .

De tous ces composés, le plus étudié et le plus répandu est le leucocyanidol (14), puis vient le leucodelphinidol .

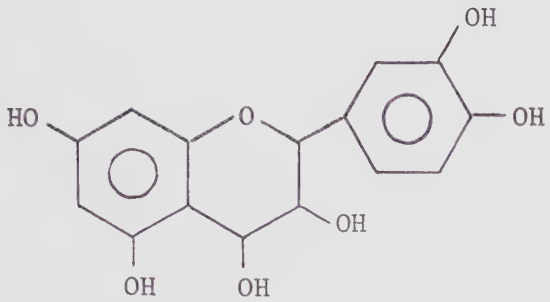
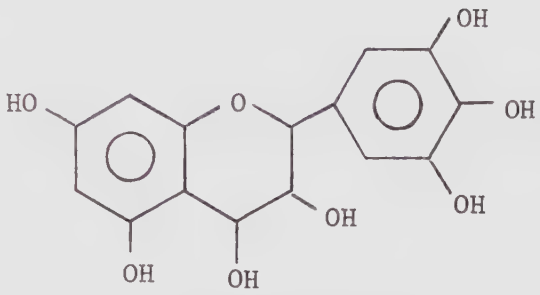


Fig. III

Leucocyanidol



Leucodelphinidol

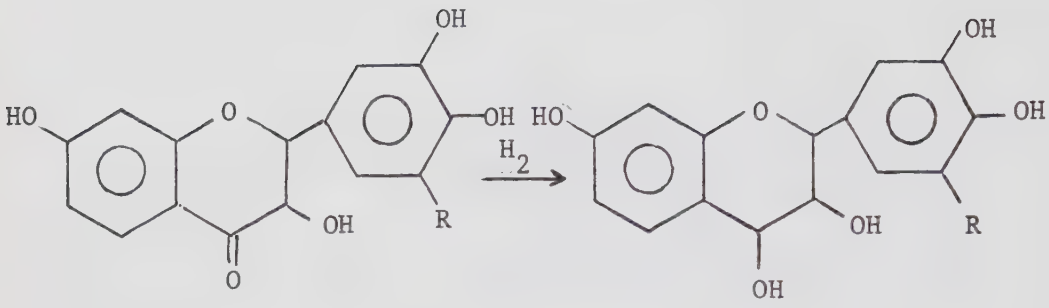
B/ STRUCTURE .

1°- Preuves chimiques .

La méthylation, l'acétylation, l'oxydation par le permanganate de potassium ou l'oxyde de manganèse et la fusion alcaline sont autant de réactions qui permettent de dénombrer et de situer les groupements hydroxyles sur le noyau flavannique (43) .

2°- Synthèse .

La preuve finale, la plus sûre, demeure la synthèse . Elle s'effectue le plus souvent par la réduction du flavanonol correspondant, à l'aide d'hydrure de lithium ou d'aluminium, de borohydrure de potassium ou de sodium (118) ou par hydrogénation catalytique . De cette façon, la synthèse directe du flavannediol-3,4, du leucofisétinidol et du leuco-robinétinidol a pu être réalisée .



R = H : Fustine

R = OH: Dihydrorobinétol

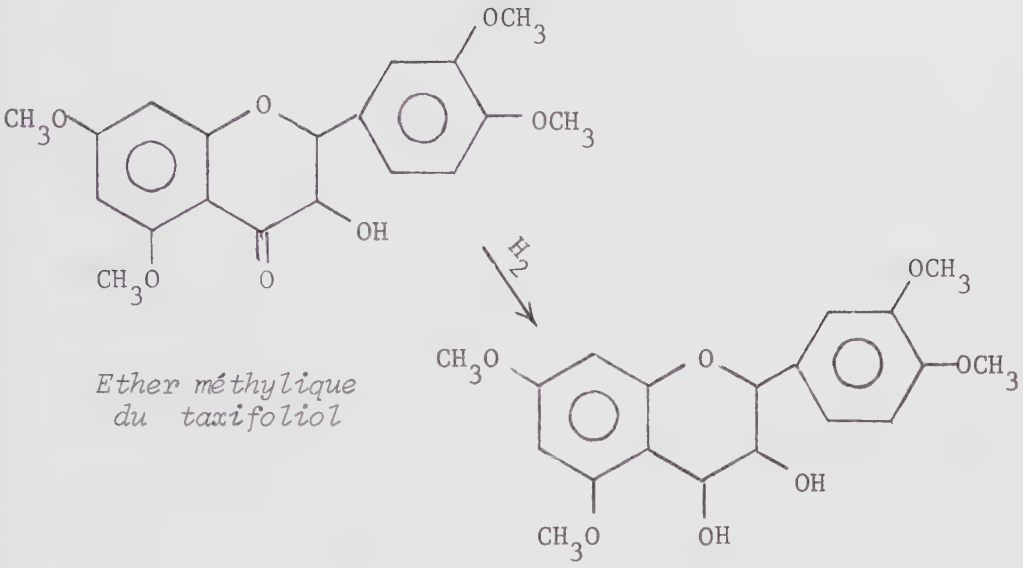
R = H : Leucofisétinidol

R = OH : Leucorobinétinidol

Fig. IV

Il n'en va pas ainsi cependant pour les composés hydroxylés en 5 et 7 . Cette disposition fait apparaître une structure phloroglucinol dont les carbones en 6 et 8 sont particulièrement réactifs . En milieu acide, il y a facilement formation chez la molécule flavannediol nouvellement produite d'un ion carbonium en 4 qui réagit aussitôt avec l'un des centres nucléophiles situés en 6 et 8 d'une autre molécule . Il y a polymérisation .

Or, l'emploi de borohydrure conduit à la formation de complexes entre le bore et les fonctions hydroxyles, et des conditions acides sont précisément nécessaires à la destruction de ces chélates . En fabricant des éthers méthyliques (84) ou éthyliques (263) du flavanonol correspondant, on ne contourne que partiellement le problème : on obtient la leucoanthocyanne sous forme éthérifiée et non pas sous forme libre .

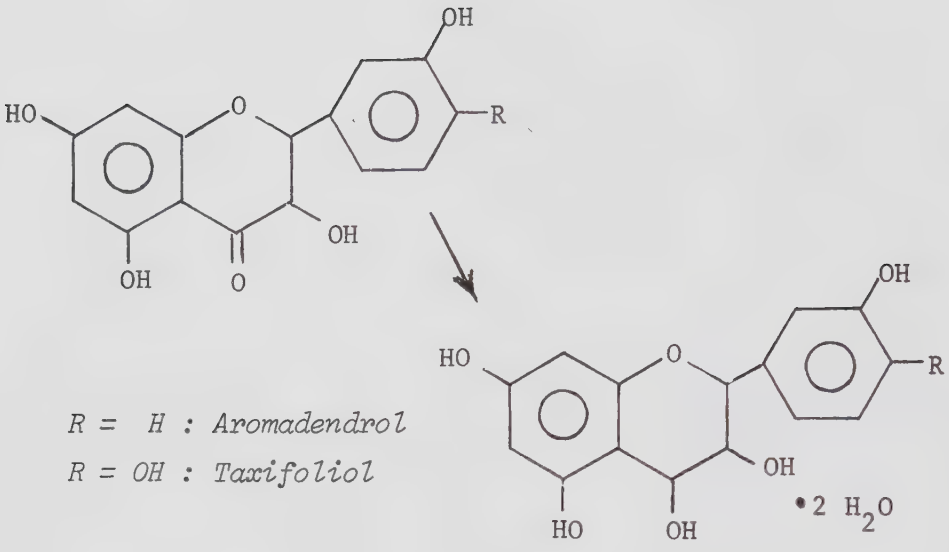


Ether méthylique du taxifoliol

Ether méthylique du leucocyanidol

Fig. V

Récemment, MICHAUD et MASQUELIER (201) ont mis au point une méthode simple et efficace pour la synthèse directe du leucocyanidol, sans aucune éthérification préalable . Le point essentiel de l'opération est la décomposition du complexe boré sans provoquer de polymérisation . Pour y parvenir, les auteurs utilisent un milieu méthanolique qui n'est que légèrement acide . Le résidu obtenu par évaporation est ensuite repris par une solution saturée de chlorure de sodium . On connaît depuis longtemps les propriétés électives de cette saturation en faveur des composés peu condensés (174, 197) . La solution est ensuite extraite par de l'acétate d'éthyle . Une fois concentrée sous pression réduite, on ajoute à cette dernière quelques gouttes d'eau essentielles à la cristallisation subséquente . Le rendement atteint 50 % . On obtient de même le leucopélargonidol à partir de l'aromadendrol .



R = H : Aromadendrol
R = OH : Taxifoliol

R = H : Leucopélargonidol
R = OH : Leucocyanidol

Fig. VI

En plus de nous permettre la confirmation de la structure des leucoanthocyannes en comparant les propriétés des produits synthétiques et naturels, ce genre de synthèse nous fournit le composé sous forme monomère, forme pratiquement inaccessible actuellement par extraction des produits végétaux .

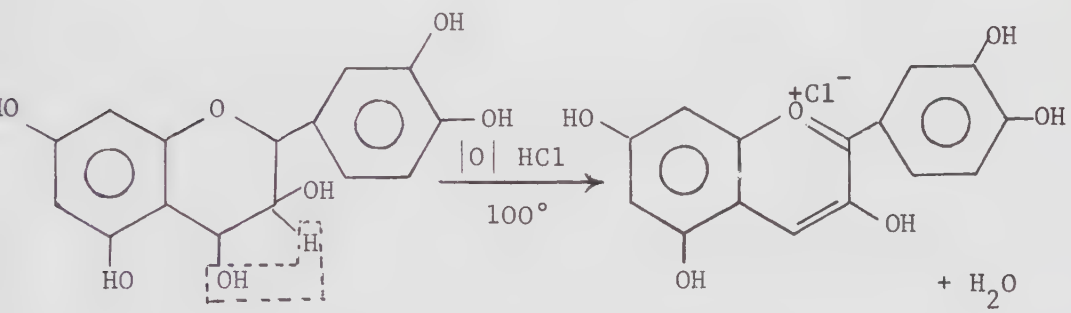
3°- Stéréoisomérie .

Comportant trois carbones asymétriques, en 2, 3 et 4, les leucoanthocyannes peuvent donc exister sous huit formes isomères différentes (268) . WHALLEY (293, 294) propose deux configurations spatiales de base, fondées sur la déformation du noyau pyranique . La conformation en "demi-chaise" semble toutefois la plus fréquente .

C/ PROPRIETES CHIMIQUES .

1°- Transformation en anthocyannes.

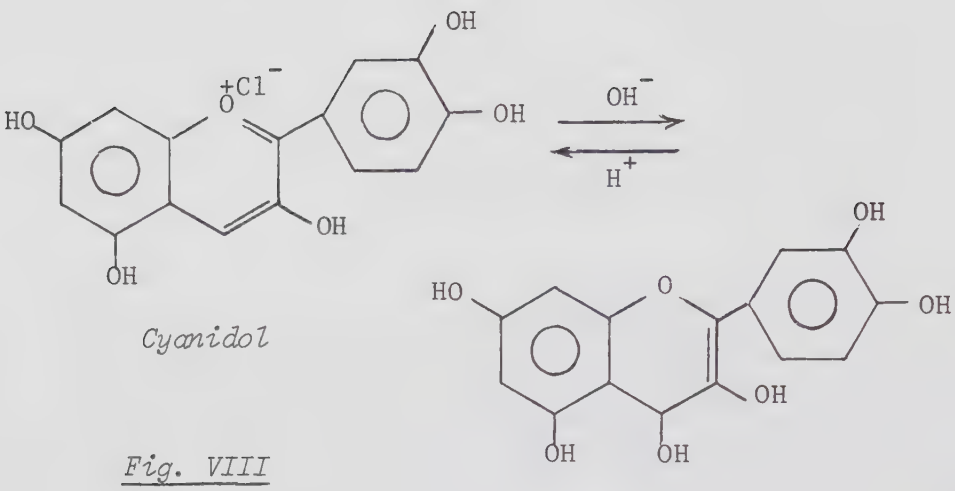
Chauffée à 100° C pendant quelques minutes, une solution acide de leucocyanidol se colore en rouge . Il y a formation du pigment anthocyannique correspondant: le cyanidol (274) . Cette réaction est tout à fait spécifique aux leucoanthocyannes . Elle consiste en une déshydratation et une oxydation du chromogène . La structure flavannediol-3,4 est essentielle à la conversion .



Leucocyanidol *Cyanidol*

Fig. VII

Une alcalinisation supérieure à pH 4 décolore la solution anthocyannique : le cathion flavylium s'épimérise en pseudo-base incolore . Une simple acidification à froid reforme le composé coloré . Cette dernière réaction distingue essentiellement la pseudo-base de la leucoanthocyanne . Avec cette dernière, la conversion exige et la chaleur et l'oxygène en plus de l'acidification .



Cyanidol

Pseudo-base incolore

Fig. VIII

De telles conditions opératoires semblent incompatibles avec la fragilité de la cellule vivante . SESHADRI (251) fait cependant remarquer que cette réaction peut fort bien se faire sous contrôle enzymatique . Elle serait dissociée : il y aurait d'abord déshydratation, puis oxydation . Il faut dire, à l'appui de cette thèse, qu'une telle procédure augmente sensiblement le rendement en anthocyanidol lorsqu'elle est employée "in vitro" .

Cette pigmentogénèse, si vraiment elle existe "in vivo", ne peut expliquer que très partiellement le rôle biologique des leucoanthocyannes . En particulier :

- plusieurs plantes incolores (ex: les raisins blancs) possèdent des leucoanthocyannes qui ne sont jamais transformées en pigments colorés (195)
- plus de 50 p 100 des plantes formant des anthocyannes à l'automne (rougissement des feuilles) sont préalablement dépourvues de leucoanthocyannes (voir à ce sujet la référence (177)-) .
- chez les plantes contenant des leucoanthocyannes, il arrive souvent que les pigments anthocyanniques formés ne correspondent pas aux leucodérivés qu'elles renferment (id.) .

Il faut donc chercher à ces composés une autre fonction au sein du végétal .

2°- Polymérisation .

En 1947, TAYEAU et MASQUELIER (273) réussissent pour la première fois à isoler une leucoanthocyanne à l'état pur . MASQUELIER note à ce sujet : "Dès nos premiers essais sur le chromogène, nous avons remarqué qu'une solution aqueuse du produit pur, abandonnée à l'air, ne tarde pas à prendre une coloration rougeâtre s'accentuant à la longue, tandis qu'un précipité de même couleur se dépose au fond du récipient . A ce moment, la fraction demeurée en solution se comporte exactement comme le tannoïde ". Un peu plus loin, l'auteur ajoute : "Nous pensons que cette transformation du chromogène résulte d'une oxydation lente au contact de l'air, car l'addition de traces de substances réductrices (sulfite acide de sodium, hydrosulfite de sodium) entrave la formation du composé coloré et du précipité" . S'appuyant sur cette observation, l'auteur propose quelques années plus tard (177) de remplacer l'appellation leucoanthocyanne par celle de leucotannoïde qui semble bien plus près de la réalité .

Confirmant l'hypothèse de MASQUELIER , HILLIS (114-116) démontre que les leucoanthocyannes fonctionnent "in vivo" comme les précurseurs des tannins condensés et BATE -SMITH (12) écrit à ce sujet : ... " there is, in many plants, a soluble leucoanthocyanin fraction which has all the properties of "tannin" , and is, in fact, the most commonly occuring of the so-called vegetable "tannins" . ROUX (237) prétend pour sa part que les tannins commerciaux extraits d' Acacia mollissima (mimosa) et de Schinopsis balansae (quebracho) sont constitués en majeure partie par des polymères du leucorobinétinidol et du leucofisétinidol .

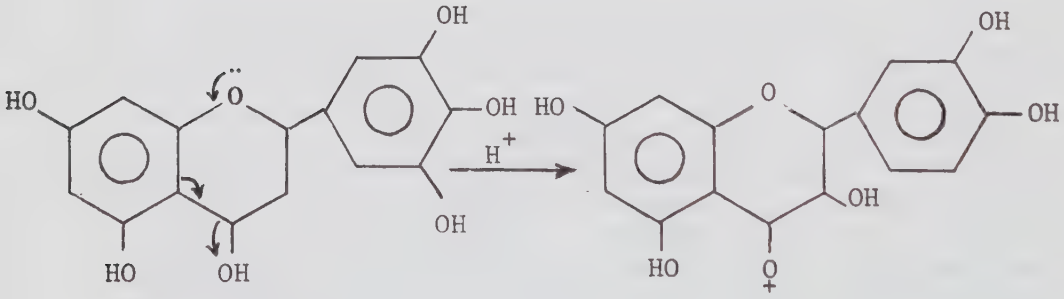
A l'heure actuelle, on admet que les leucoanthocyannes peuvent se transformer en tannins de deux façons différentes :

a) Catalyse acide .

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer la polymérisation des flavannediols-3,4 en

milieu acide (101, 124) . Nous nous bornerons ici à une seule d'entre elles . Elle nous paraît en effet, particulièrement intéressante .

En milieu acide les hydroxyflavannediols-3,4 se polymérisent beaucoup plus rapidement que les flavannols-3 correspondants . Il semble bien que cela soit dû à la formation en 4 d'un ion carbonium . Devenu électrophile, il réagit aussitôt avec l'un des centres nucléophiles d'une autre molécule . Dans le cas des composés à structure phloroglucinol en A, ces derniers sont constitués par les carbones 6 et 8 . Selon la majorité des auteurs (101) il est admis que cette addition se ferait préférentiellement en 8 . Chez les chromogènes ne possédant pas cette structure, la condensation se ferait beaucoup plus lentement, par suite d'une intensité électronique moindre au niveau des carbones du noyau A . Ce phénomène pourrait expliquer la facilité avec laquelle on arrive à synthétiser le leucofisétinidol en milieu acide sans qu'il se produise une polymérisation trop poussée .



Leucocyanidol *Ion carbonium*

Fig. IX

FORMATION D'UN ION CARBONIUM EN MILIEU ACIDE (101).

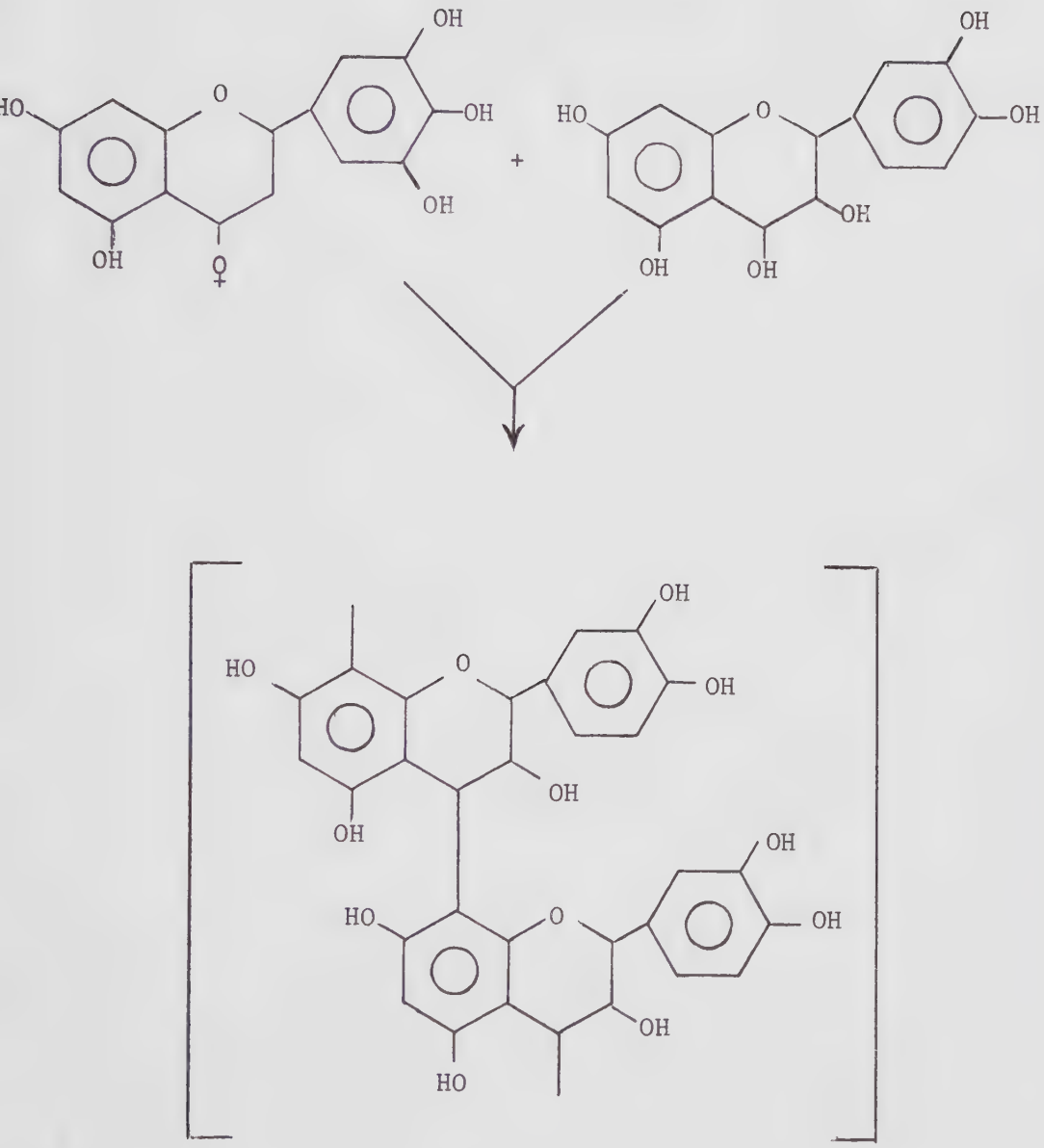


Fig. X

CONDENSATION ACIDE DU LEUCOCYANIDOL.

Selon FREUDENBERG (79, 80), le chauffage en milieu acide romprait les liens 4-8 ou 4-6 pour donner un flavenol-3 et un flavannediol-3, 4 susceptibles de se transformer tous deux, en partie du moins, en anthocyanidol .

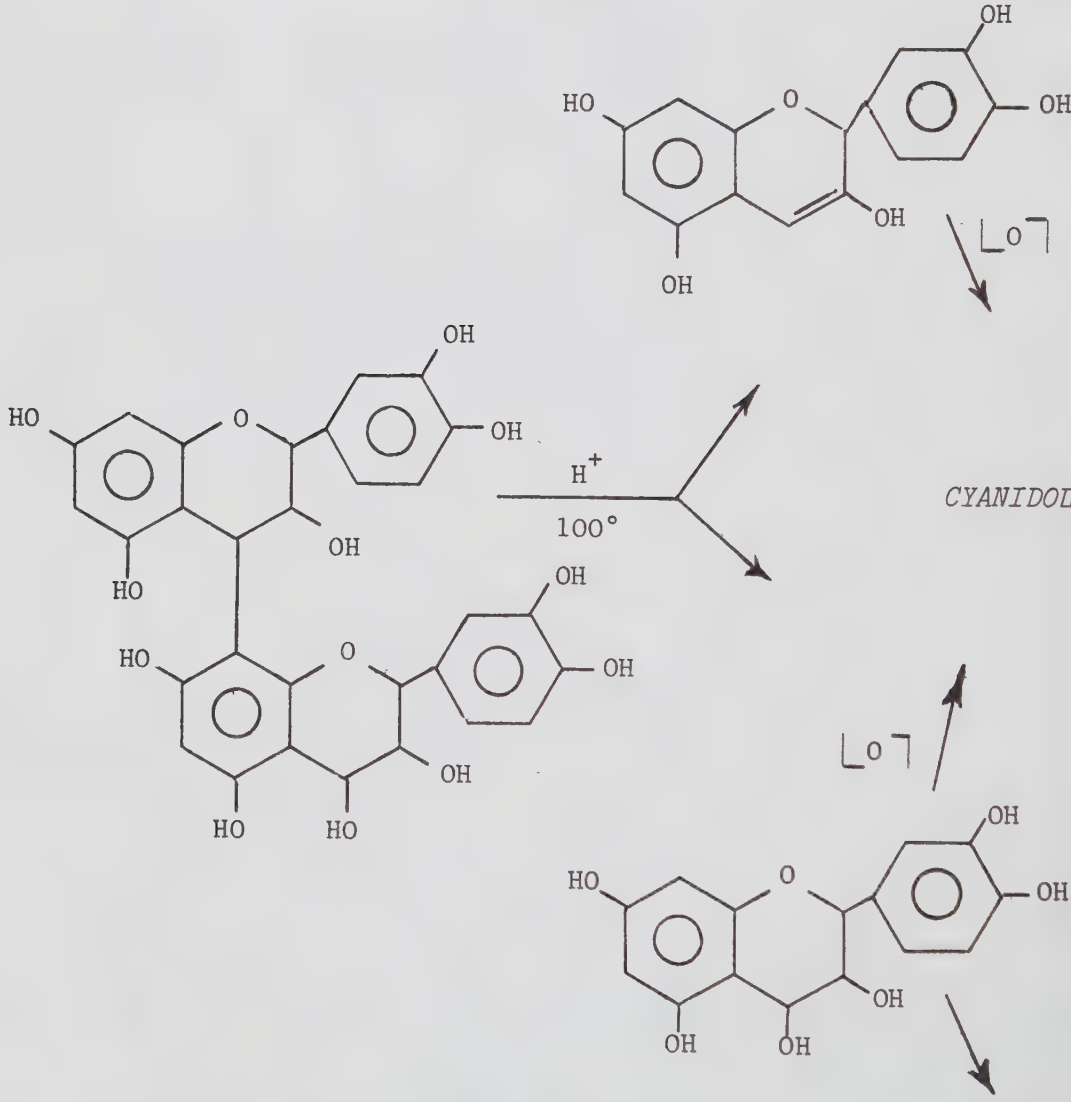
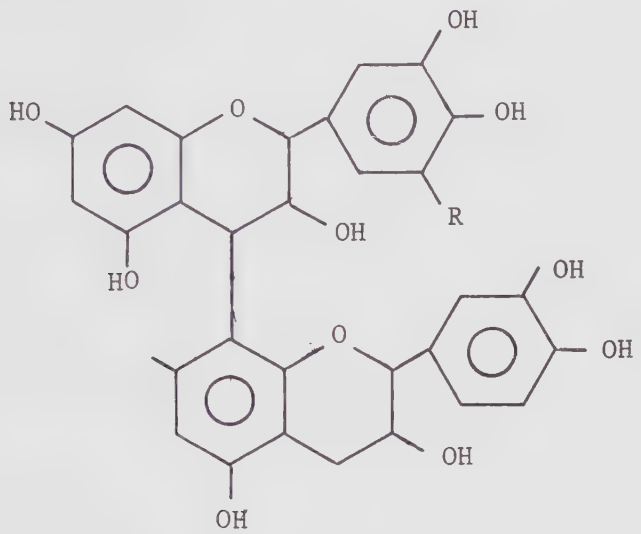


Fig. XI

TRANSFORMATION EN CYANIDOL DU PRODUIT DE CONDENSATION DU LEUCOCYANIDOL (79,80)

Dans le cas d'un mélange flavannediol-3,4 et flavanol-3, il peut se former un dimère particulièrement stable, étant donné la relative inertie de la molécule catéchique en 4 . Plusieurs auteurs ont proposé la structure suivante dans le cas d'une association leucocyanidol ou leucodelphinidol-catéchine :



R = H : Leucocyanidol-catéchine (51) (228)
R = OH : Leucodelphinidol-catéchine (146)

Fig. XII

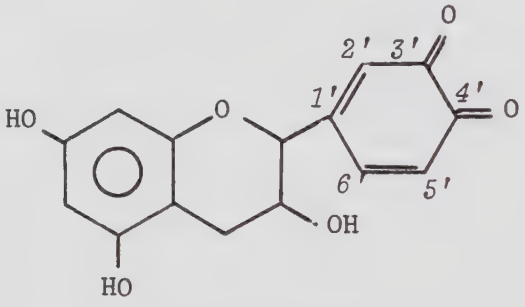
b) Condensation par oxydation .

L'essentiel des travaux en ce domaine a été effectué par HATHWAY et SEAKINS (104) sur la catéchine. Comme il est maintenant admis que les leucoanthocyannes réagissent d'une façon similaire à l'oxydation (267) , il nous paraît intéressant d'en noter les principaux points .

1- Autoxydation .

Une solution de catéchine tamponnée à pH 8 et abandonnée à l'air s'oxyde rapidement en un tannoïde de couleur rouge . La réaction est complètement inhibée en présence de réducteurs ou en l'absence d'oxygène . MASQUELIER (174) observe le même phénomène avec le leucocyanidol .

A la suite d'études manométriques et spectrophotométriques, HATWAY et SEAKINS (105) proposent , comme première étape de cette condensation, la formation en B d'une structure quinonique .



Quinone de la catéchine

Fig. XIII

Trois faits précis déterminent les auteurs à proposer, comme seconde étape, une liaison tête-à-queue entre le carbone électrophile 6' de la molécule quinonique et l'un des carbones nucléophiles du noyau phloroglucinol d'une autre molécule :

α- Etude spectrale .

D'après les spectres d'absorption de leurs produits d'oxydation, les auteurs divisent les composés suivants en deux groupes :

Groupe 1 :

- le catéchol
- la 5-7 di-O-méthylcatéchine
- le 3', 4' dihydroxyflavanne

Groupe 2 :

- le mélange homocatéchol + 5 méthoxy-4-méthyle résorcinol
- la catéchine
- la 5, 7, 3', 4' tétrahydroxyflavanne .

A l'intérieur d'un même groupe, les spectres d'absorption des produits d'autoxydation des différents composés présentent des similitudes qui font croire que les formes monomères sont liées entre elles d'une façon identique . Cette analogie entre la catéchine et le mélange homocatéchol + 5 méthoxy-4-méthyl résorcinol suggère une liaison tête-à-queue chez le polymère catéchique(106).

Si dans ce mélange, on remplace l'homocatéchol par le 4, 5-dimétylcatéchol, l'addition des deux composés n'a plus lieu . Cette position 5 de l'homocatéchol correspond précisément au carbone 6' de la catéchine .

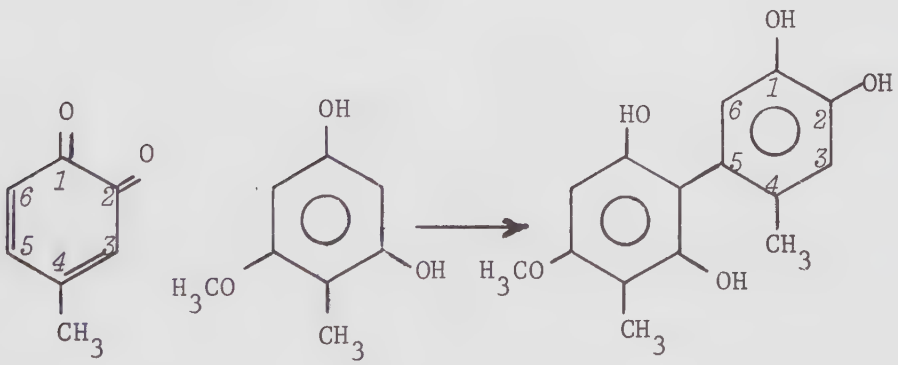


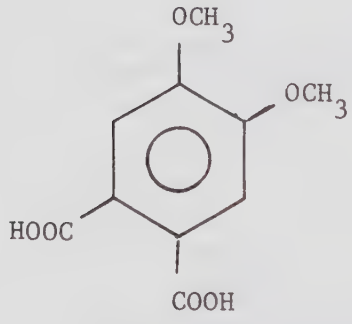
Fig. XIV

β - Produits de dégradation (103)

Le polymère d'autoxydation de la catéchine ne se colore plus à la vanilline . Le noyau phloroglucinol participe à la réaction .

γ - Produits de dégradation (103)

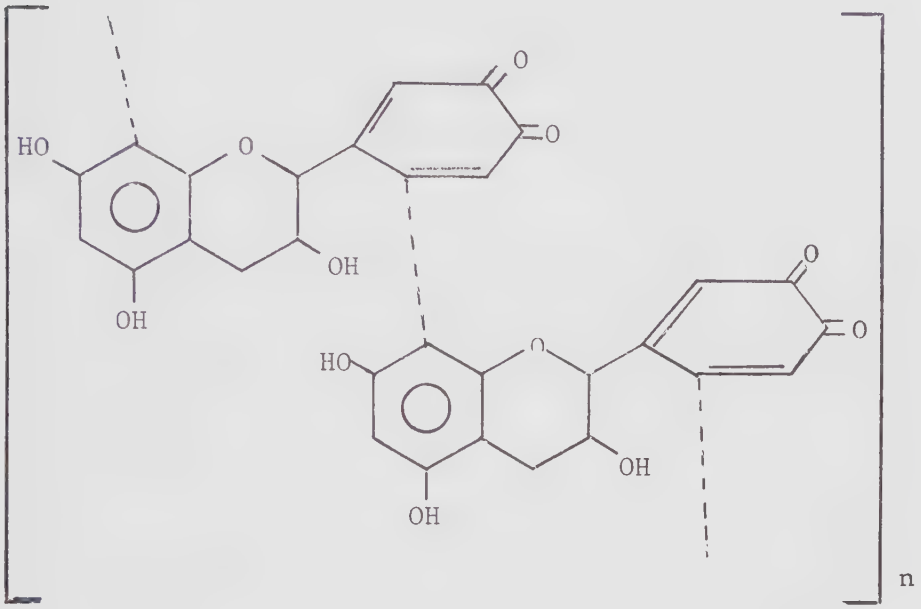
La réduction, la méthylation au diazométhane puis l'oxydation par le permanganate de potassium du polymère d'autoxydation de la catéchine donnent de l'acide m - hémipinique (2 p 100), de l'acide vératrique (0, 5 p 100) et de l'acide oxalique . La présence d'acide m-hémipinique que l'on ne retrouve pas par dégradation du polymère produit en milieu acide, laisse supposer une addition au niveau du noyau B, et sur le carbone 6 ' .



Acide m-hémipinique

Fig. XV

Avec la catéchine, le polymère obtenu pourrait donc répondre à la structure suivante :



Les mêmes études répétées avec la gallocatéchine et le leucodelphinidol allaient cependant prouver que les composés possédant une structure pyrogallol en B s'unissaient par liaisons queue-à-queue (102). Les travaux de TAKINO et coll. (271) ont confirmé ces résultats (Figure XVII).

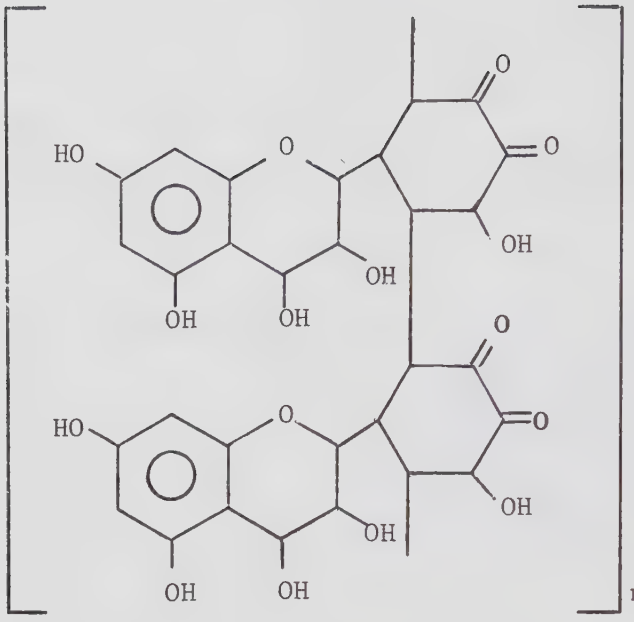


Fig. XVII

POLYMERE DU LEUCODELPHINIDOL OBTENU PAR OXYDATION

2- Oxydation enzymatique .

Selon leurs différentes propriétés, les enzymes responsables de l'oxydation des polyphénols se divisent en trois classes (108) (255) :

α- Les tyrosinases .

L'oxydation enzymatique de la catéchine par la tyrosinase de Psalliota campestris donne un polymère ayant les mêmes propriétés que celui obtenu par autoxydation . Tous deux demeurent à l'origine des chromatogrammes, sont retenus par la poudre de peau et sont précipités par la gélatine . Leurs spectres d'absorption sont quasi identiques (107) .

L'hypothèse selon laquelle la première étape de la polymérisation par oxydation est la formation d'une

quinone se trouve une fois de plus confirmée : des études du spectre de résonance électroparamagnétique ont prouvé de façon formelle que le produit initial résultant de l'action de la tyrosinase de P. campestris était une forme quinonique (173) .

β- Les laccases .

Par action de la laccase de Polyporus versicolor sur la catéchine, BROWN et BOCKS (33) obtiennent un polymère possédant les mêmes propriétés que ceux de HATWAY et SEAKINS . Il est à remarquer cependant que ce groupe d'enzymes n'agit non pas par formation de quinone (transfert de deux électrons) mais par production initiale d'un radical libre appelé aussi semiquinone (transfert d'un seul électron) .

La quinone et le radical libre formés au début sont interconvertibles . Cette dernière réaction échappe cependant au contrôle enzymatique . Elle dépend essentiellement des conditions du milieu : pH, concentration ionique ....

L'on pourrait schématiser l'oxydation enzymatique de la catéchine de la façon suivante :

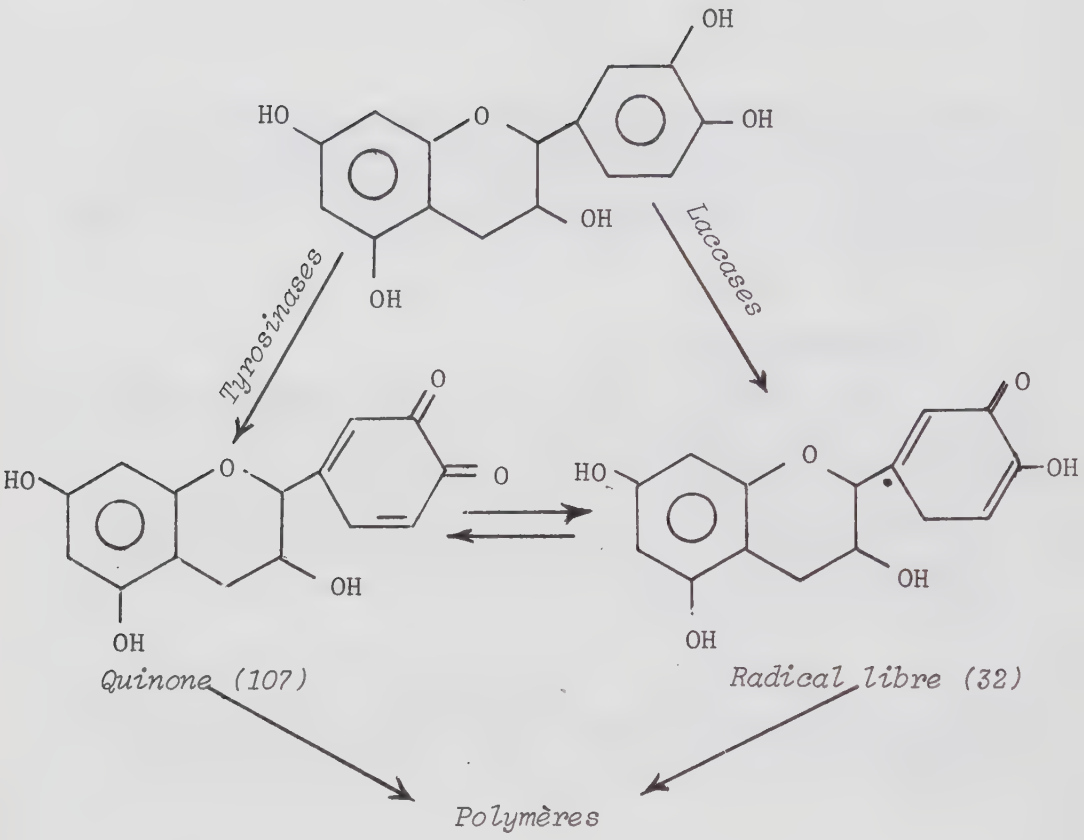


Fig. XVIII

OXYDATION ENZYMATIQUE DE LA CATECHINE

γ- Les peroxydases .

En ce qui concerne la structure flavannique, elles n'ont fait l'objet d'aucune étude approfondie . HATWAY et SEAKINS (107) se bornent à constater que le polymère produit sous leur action possède un spectre d'absorption bien différent de ceux observés précédemment .

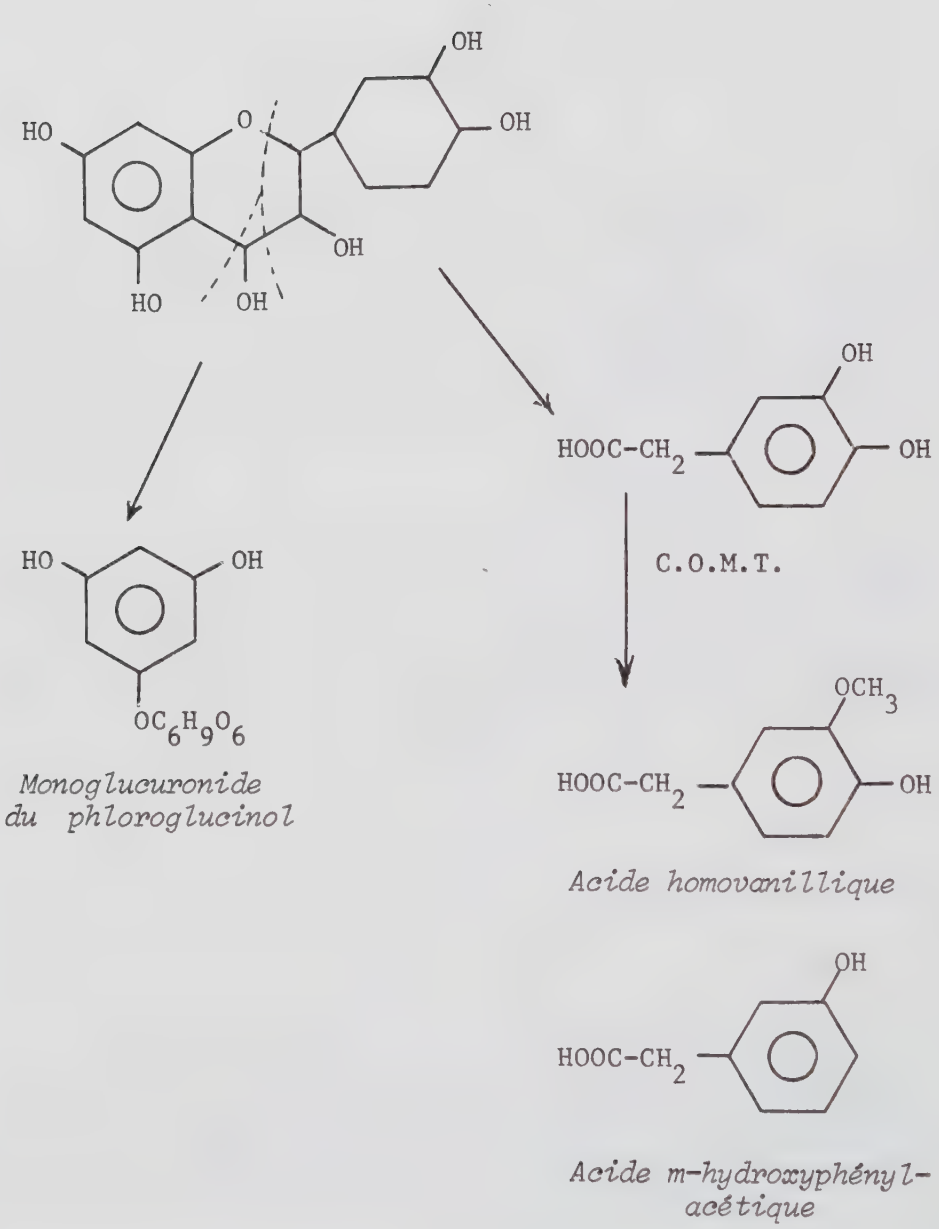
D/ ACTIONS PHARMACOLOGIQUES .

1°- Résistance capillaire.

MASQUELIER a été le premier à mettre en évidence l'augmentation de la résistance des capillaires par le leucocyanidol (174) (275) . Les formes peu condensées sont les plus actives . Elles sont peu toxiques . Le tannoïde, au contraire, peut provoquer, par voie parentérale, des phénomènes toxiques graves (193, 215) .

Mécanisme :

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer le mécanisme de ce phénomène (183) . Selon MASQUELIER et coll. (187) , le leucocyanidol s'opposerait au catabolisme rapide de l'adrénaline en étant lui-même méthylé par la catéchol-O-méthyltransférase . Cet enzyme inactive l'adrénaline en fixant un radical méthyle sur l'une de ses fonctions phénoliques .



Monoglucuronide du phloroglucinol

Acide homovanillique

Acide m-hydroxyphényl-acétique

Fig. XIX

DEGRADATION "IN VIVO" DU LEUCOCYANIDOL (187)

En se méthylant à la place de l'adrénaline , la molécule flavannique, ou l'un de ses produits de dégradation, prolongerait l'action sympathicomimétique au niveau des petits vaisseaux .

Des essais effectués chez des rats allaient confirmer cette thèse . Après administration de leucocyanidol, que ce soit par voie orale ou intrapéritonéale, on retrouve dans les urines de l'acide homovanillique qui résulterait, selon les auteurs, de l'action de la C. O. M. T. sur l'un des produits de dégradation du leucocyanidol, l'acide 3, 4-dihydroxyphénylacétique . L'on pourrait schématiser la dégradation "in vivo" du leucocyanidol tel qu'indiqué en figure XIX .

2° - Inhibition enzymatique .

La première observation d'une inhibition enzymatique par une préparation relativement pure d'une leucoanthocyanne fut celle de MASQUELIER (175) sur l'oxydase de l'acide ascorbique par le leucocyanidol .

Par la suite, plusieurs auteurs constatèrent un phénomène semblable sur divers enzymes pectiques . Citons, entre autres, BELL et ETCHELLS (20, 21), BYRDE et coll. (38), COLE (47, 300), POLLARD et coll. (223), PORTER et SCHWARTZ (225) et WILLIAMS (297) .

D'autres enzymes sont aussi affectés : la succinoxydase (122, 123), la malate déshydrogénase (269), la cellulase (19), l'oxydase de l'acide indole acétique (93 , 189) et, comme nous venons de le voir, la catéchol-O-méthyltransférase (44, 187) .

Mécanisme .

De par leur nature protéique, les enzymes réagissent avec les tannins en donnant des complexes plus ou moins solubles dûs à la formation de ponts hydrogène . Il s'établit un équilibre dépendant de plusieurs facteurs , dont le pH (82) (203), la concentration ionique (89), la nature de la protéine et du tannin, leurs dimensions , leurs

configurations spatiales, leurs concentrations . La solubilité du complexe formé dépend également de ces nombreux facteurs (41) .

$$E + T \rightleftharpoons ET$$

Comme la protéine n'est pas dénaturée et que les sites actifs ne sont pas tous nécessairement touchés, il arrive que le précipité formé conserve une certaine activité .

Ce complexe enzyme-tannin est facilement dissociable par certains tensio-actifs, tels le Tween 80, et par certains polymères synthétiques comme la polyvinylpyrrolidone (73, 122, 123) . Le mécanisme d'action de cette dernière est particulièrement intéressant .

Les tannins se fixent sur la molécule synthétique comme ils le font sur les protéines, c'est-à-dire par liaisons hydrogène entre les hydrogènes de leurs fonctions phénols et l'oxygène de la liaison peptidique . Lors de l'addition de PVP à un mélange enzyme-tannin, une partie du tannin se détache de l'enzyme pour se lier au polymère synthétique de façon à se répartir le plus uniformément possible entre les liaisons peptidiques . En jouant sur les rapports des concentrations enzyme-PVP, on peut arriver à libérer une bonne partie de l'enzyme .

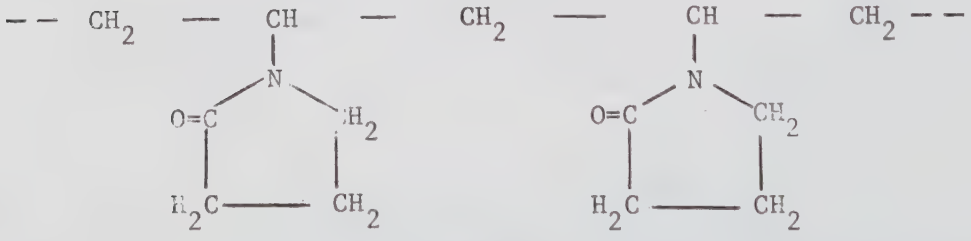


Fig. XX

POLYVINYLPYRROLIDONE

Avec le temps, il se forme des liens indissociables susceptibles de dénaturer la protéine et de détruire ainsi toute activité enzymatique (96) . Ce phénomène pourrait peut-être expliquer le fait que les tannins condensés de type leucoanthocyanne, facilement oxydables, forment des associations plus difficiles à cliver (89) .

Dans certains cas, l'inhibition peut se faire par tannage du substrat . Ainsi, BENOIT (23) a mis en évidence des associations cellulose-tannin inattaquables par voie enzymatique . Le tannin employé était du type condensé à base de leucoanthocyannes (mimosa) .

3°- Activité antivirale .

Plusieurs plantes possèdent des propriétés antivirales (168, 169) . Comme la plupart des essais ont été effectués à partir d'extraits mal définis, il reste à déterminer la nature des constituants actifs .

Les virus étant des nucléoprotéines, l'on peut s'attendre à ce que les molécules tannantes, en les précipitant, empêchent leur diffusion et, par conséquent, inhibent, en partie du moins, l'infection virale (39, 295) . HOLDEN (117) remarque à ce sujet que les feuilles de cacaoyer infestées par des virus sont susceptibles de contenir une plus grande quantité de leucoanthocyannes .

Les études les plus intéressantes effectuées jusqu'à maintenant nous semblent être celles de COLE et BUCHALTER (35, 46) . Ces deux auteurs ont précisé le rôle inhibiteur certain de polymères du leucocyanidol, du leucodelphinidol et du leucopélargonidol sur les souches Sarcoma et Walker 256 du sarcome de la souris . Les fractions actives sont hydrosolubles, mais non extractibles de leurs solutions aqueuses par l'acétate d'éthyle . Elles doivent donc atteindre un certain degré de polymérisation qui n'est pas étranger au pouvoir tannant .

4°- Activité antibiotique.

Plusieurs flavonoïdes sont pourvus d'une activité antibiotique (227) . Citons, parmi les anthocyannes, le malvidol (134, 178, 179, 190, 191), le cyanidol (121), le fisétinidol (81), et parmi les flavonols, le quercétol (208, 184) et le fisétol (81) .

Plusieurs travaux ont mis en évidence les propriétés fongistatiques de divers extraits tannants susceptibles de contenir des leucoanthocyannes (11, 28, 132, 149, 242) . Ils nous semble imprudent de tirer des conclusions définitives de ces essais, étant donné le peu de précisions dont nous disposons sur la composition exacte des préparations étudiées . Les essais effectués à partir de préparations purifiées sont loin de donner des résultats aussi nets .

Etudiant les effets du leucocyanidol à des concentrations de 0, 17 et 0, 34 p 100 sur la respiration d' Escherichia coli en milieu tamponné, SOMAATMADJA et coll. (257) obtiennent une stimulation respiratoire marquée en milieu neutre . Le même effet est obtenu, quoique à un degré moindre, en milieu acide . Salmonella enteridis et Shigella paradysenteriae réagissent d'une façon analogue .

A la concentration de 0, 1 p 100 , les leucoanthocyannes prolongent la phase de latence et inhibent sensiblement le développement et l'activité fermentaire de Saccharomyces ellipsoideus . PERI (218) attribue ces phénomènes à une fixation en surface des molécules tannantes.

E/ PROPRIETES PHYSIQUES .

1°- Description du produit d'extraction .

Les extraits végétaux de leucoanthocyannes sont en général constitués par une poudre amorphe plus ou moins colorée en rouge brunâtre et ne possédant pas de point de fusion caractéristique . Il s'agit en fait d'un mélange de différents stéréoisomères plus ou moins polymérisés (voir extraction tableau III) .

2°- Solubilités.

D'après leurs solubilités, les leucoanthocyannes peuvent se diviser en trois fractions :

a) Les formes peu condensées, extractibles de leurs solutions aqueuses par l'acétate d'éthyle (du monomère au trimère) .

b) Les formes hydrosolubles, mais non extractibles par l'acétate d'éthyle . Ce sont les tannoïdes . Ils se subdivisent en deux groupes :

- les formes non précipitées par une saturation au chlorure de sodium (du trimère à l'hexamère).
- les formes précipitées par cette saturation (de l'hexamère au décamère) .

c) Les formes insolubles dans l'eau et les solvants organiques usuels . Ce sont les phlobaphènes .

Les formes solubles dans l'eau le sont aussi dans le méthanol , l'éthanol, l'acétone, mais sont insolubles dans l'éther de pétrole, le chloroforme... etc .

3°- Propriétés spectrales.

En milieu éthanolique, le leucocyanidol se caractérise par un maximum à 280 nm.

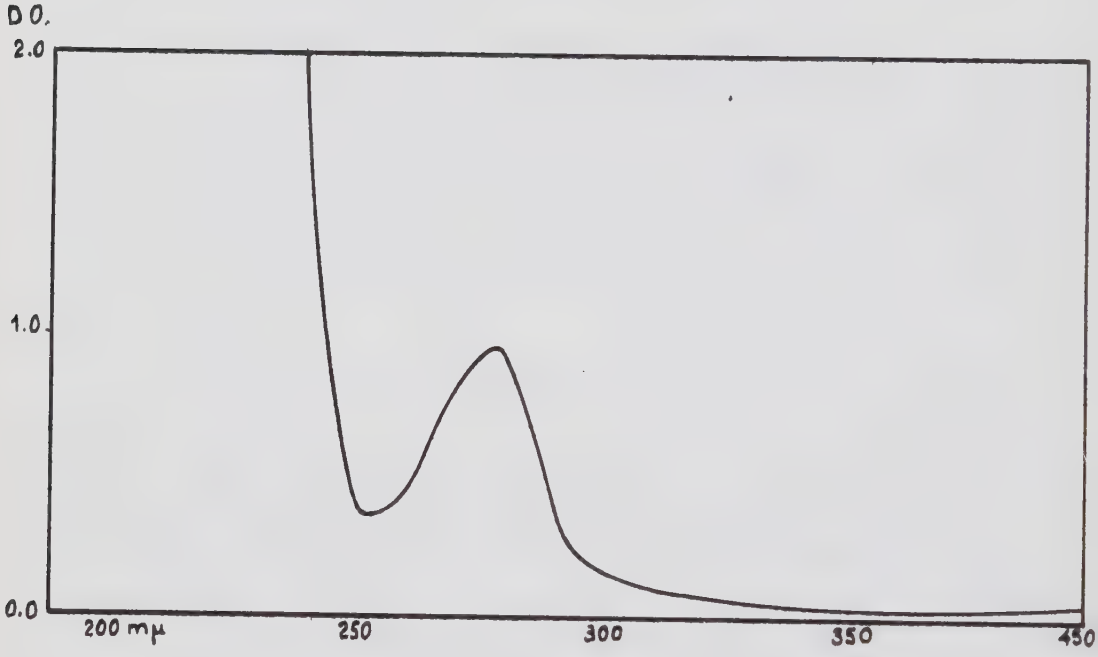


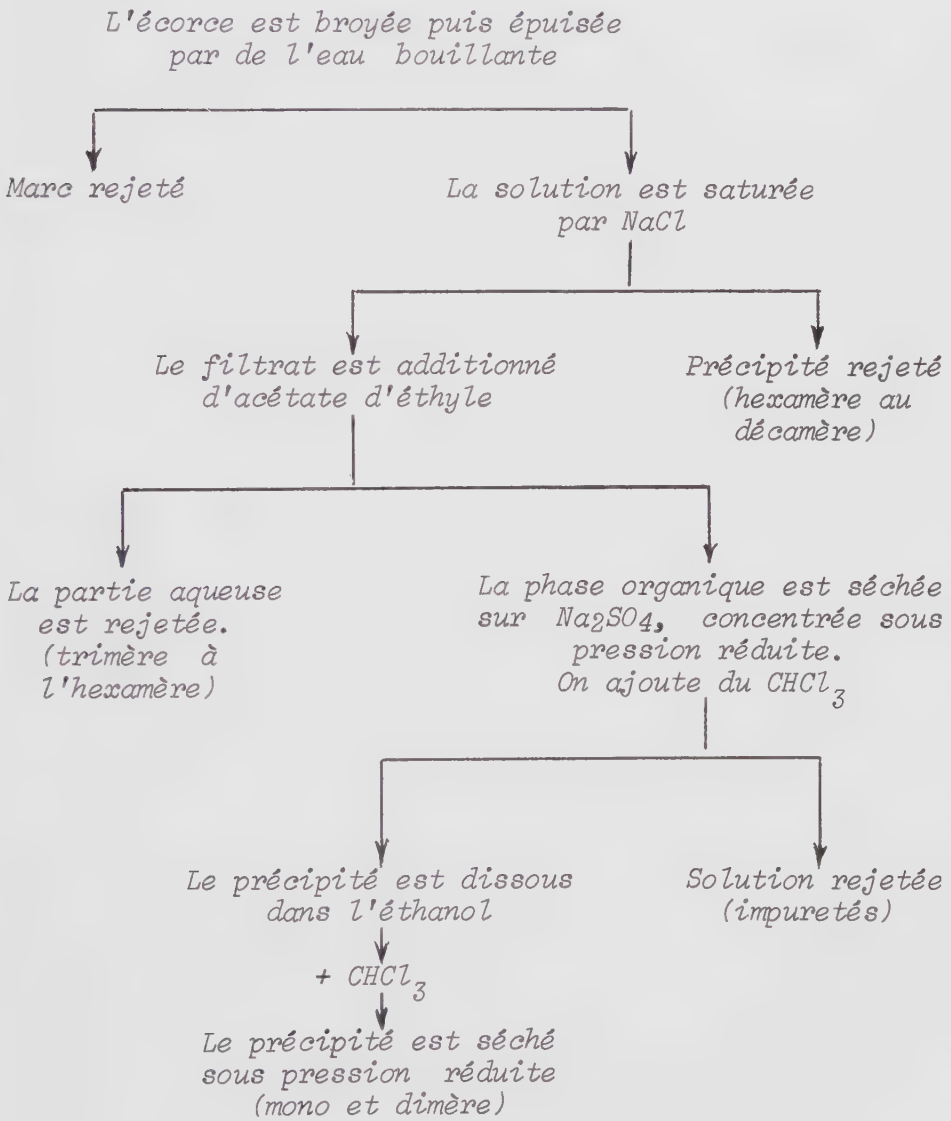
Fig. XXI

SPECTRE D'ABSORPTION DU LEUCOCYANIDOL 0,2 mM EN MILIEU ETHANOLIQUE (96 p 100).

Appareil utilisé : Unicam SP 800 enregistreur.
Transcription d'un résultat obtenu par MASQUELIER (185).

T A B L E A U III

EXTRACTION DU LEUCOCYANIDOL DE PINUS MARITIMA (192)


L'écorce est broyée puis épuisée par de l'eau bouillante
Marc rejeté
La solution est saturée par NaCl
Le filtrat est additionné d'acétate d'éthyle
Précipité rejeté (hexamère au décamère)
La partie aqueuse est rejetée. (trimère à l'hexamère)
La phase organique est séchée sur Na_2SO_4, concentrée sous pression réduite. On ajoute du $CHCl_3$
Le précipité est dissous dans l'éthanol
Solution rejetée (impuretés)
+ $CHCl_3$
Le précipité est séché sous pression réduite (mono et dimère)

D E U X I E M E P A R T I E

RECHERCHES EXPERIMENTALES

CHAPITRE III

ESSAIS SUR L'ACTIVITE LEVURICIDE DE DIFFERENTS MELANGES LEUCOCYANIDOL + CUIVRE

°°°

A_/ IDENTIFICATION DES SOUCHES DE CANDIDA ALBICANS UTILISEES .

Les souches utilisées ont été isolées de prélèvements pathologiques effectués en milieu hospitalier . Nous avons attaché une importance toute particulière aux méthodes d'identification . Elles nous ont servi non seulement pour identifier les souches en provenance de l'hôpital, mais surtout pour bien caractériser les levures isolées des animaux lors de notre expérimentation " in vivo" rapportée au chapitre V .

1°- Filamentation .

S'appuyant sur les observations de HILL et GEBHARDT (113) puis de YOUNG (301), TASCHDJIAN , BURCHALL et KOZIN (272) mettent au point une technique simple et rapide pour l'identification de Candida albicans . Mis au contact de sérum humain, seuls Candida albicans et sa variété pathogène Candida stellatoidea produisent un tube germinatif caractéristique après un séjour de 90 minutes à 37°C. Travaillant sur 481 souches, PERCEBOIS et MONGE (217) confirment la valeur de cette épreuve et soulignent deux points particuliers :

la concentration en levures ne doit pas être trop forte et il faut éviter une contamination bactérienne trop importante .

Le sérum humain peut être remplacé par n'importe quel autre d'origine animale, le facteur essentiel faisant partie des albumines . PORTER et LYLE (224) , utilisant du blanc d'œuf, obtiennent d'excellents résultats. Le Plasma Normal Témoin délivré par la maison Mérieux nous a donné entière satisfaction .

Protocole :

Une fois dilué avec de l'eau distillée stérile, le contenu d'une ampoule de Plasma Normal Témoin est versé dans un tube à hémolyse stérile . On y émulsionne une anse d'une culture de la levure à étudier prélevée sur milieu solide . La quantité de levure ne doit pas être trop importante . Il s'agit d'obtenir une légère opalescence . Après séjour de trois heures à 37°C et fixation sur lame, on examine à l'immersion . Les cellules de Candida albicans produisent des petits tubes ne présentant aucun étranglement à leur base, ce qui les distingue des cellules bourgeonnantes .

2°- Zymogramme .

L'étude du pouvoir fermentaire constitue un critère important dans la classification des levures . Il arrive souvent à LODDER et KREGER van RIJ (157) de déterminer des espèces et même des genres d'après leur capacité à fermenter tel ou tel sucre . Cependant, plusieurs divergences subsistent . Elles sont, en général , imputables aux méthodes d'étude souvent archaïques : tubes d'Einhorn, de Durham, d'Yvan Hall .

Ainsi, la plupart des auteurs n'observent que la production d'acide lorsque Candida albicans est mis en présence de saccharose . Cependant, selon SKINNER et FLETCHER (256), une levure capable d'acidifier un

milieu à partir d'un disaccharide en fermentant l'un des deux sucres qui le composent, peut aussi, dans des conditions plus favorables, produire un dégagement gazeux. Si l'enzyme qui hydrolyse le sucre agit trop lentement, le dioxyde de carbone produit en quantité trop faible peut être absorbé dans le milieu et diffuser lentement dans l'atmosphère . L'on peut conclure à une incapacité de fermentation . Si, cependant, la quantité de sucre est augmentée, la levure repiquée plusieurs fois pour lui donner plus de vitalité et le milieu liquide remplacé par un milieu solide où la gélose se trouve en concentration optimum, il arrive souvent que l'on puisse détecter la formation de bulles de gaz .

Nous avons utilisé la technique de Segretain , Drouhet et Mariat (247) améliorée par Despeignes et Battesti (58) . Elle nous semble être actuellement celle qui donne les résultats les plus rapides tout en étant douée d'une sensibilité très satisfaisante .

Protocole :

Nous avons introduit dans un tube à hémolyse :

- 0, 2 ml d'une suspension de la levure à étudier obtenue par lavage à l'eau distillée stérile d'une culture de 48 heures sur milieu solide . Il est important, si l'on veut obtenir des résultats rapides, d'utiliser une suspension dense d'une souche nouvellement repiquée .
- un disque de papier imprégné du sucre à étudier .
- 2 ml de Purple Broth Base (Difco) additionné de 0, 8 p 100 de gélose purifiée et liquifiée à 45°C. La concentration en gélose est déterminante : dans un milieu trop mou, les bulles de gaz tendent à monter en surface et à disparaître . Une concentration trop élevée inhibe le dégagement gazeux en exerçant une pression trop importante .

Résultats :

La lecture se fait après 18 heures . Elle est assez précise pour donner un dégagement gazeux important avec le galactose . Alors que la presque totalité des auteurs ne signalent qu'une acidification à partir du saccharose, nous avons observé, en plus, la formation de bulles de gaz avec des souches revigorées, il est vrai, par plusieurs repiquages et réensemencements successifs .

TABLEAU IV

FERMENTATION DES SUCRES PAR CANDIDA ALBICANS

Glucose +	Saccharose +
Maltose +	Lactose -
Galactose +	Raffinose -

+ : fermentation (acidification et dégagement gazeux).

- : absence de fermentation.

3°- Auxanogramme :

Ce test permet, en particulier, de bien distinguer Candida albicans de sa variété C. stellatoidea qui toutes deux filamentent en sérum et produisent des chlamydospores . Il s'agit de déterminer si tel ou tel sucre peut être utilisé par la levure comme source de carbone à l'exclusion de tout autre . On ajoute à un milieu qui en est déficient mais qui contient, par ailleurs,

tous les autres éléments nécessaires à la croissance , un produit carboné et l'on détermine, s'il peut servir de substrat en observant s'il y a ou non multiplication de la levure .

Protocole :

La technique utilisée est similaire à celle adoptée par VANBREUSEGHEM (281) et DESVIGNES (59) :

- On prépare tout d'abord le milieu suivant :
  . Yeast nitrogen Base (Difco)..... 6, 7 g
  . Gélose en poudre ..... 15 g
  . Eau distillée ..... 1000 ml
  On autoclave 15 minutes à 120°C .
- On verse dans une boîte de Pétri un ml d'une suspension de la levure à étudier, obtenue par lavage d'une culture de 48 heures sur Sabouraud solide .
- On y ajoute 215 ml du milieu précédemment préparé et liquéfié à 45°C, puis on agite par rotation .
- On laisse solidifier . On sèche à 37° C.
- Des disques imprégnés des sucres à étudier sont ensuite déposés à la surface .

Résultats :

La lecture se fait en 24 heures . Le sucre est assimilé si le disque qui le contient est entouré d'un halo indiquant la croissance de la levure . Dans le cas de C. albicans , les sucres assimilés sont les mêmes que ceux qui sont fermentés .

4°- Chlamydospores :

Le développement d'un pseudomycélium est la caractéristique la plus marquante du genre Candida, et dans ce groupe, la production de chlamydospores est ce qui distingue C. albicans et sa variété C. stellatoidea des

autres espèces . Ce sont des cellules rondes ou légèrement ovales le plus souvent terminales, à paroi épaisse, mesurant de 6 à 12 µ de diamètre (les blastospores ou cellules bourgeonnantes ne mesurent guère plus de 3 à 4 µ de diamètre) (158) .

Selon MORRIS (204), la production d'un pseudomycélium est due à une altération dans le mécanisme de division , les cellules continuant, par ailleurs, à se développer normalement . Les chlamydospores constitueraient une forme de résistance à des conditions défavorables (241) .

Plusieurs milieux et procédés ont été recommandés pour accroître et hâter la production des chlamydospores . Il ressort des récentes études de REISS et de SZILAGYI (229) que les tensio-actifs jouent un rôle déclenchant indéniable, ce qui explique sans doute l'efficacité des sels biliaires (216) .

Protocole :

1- Milieu P. C. B. (pomme de terre, carotte et bile)

Nous l'avons ensemencé en pratiquant une strie légèrement en profondeur sur la tranche d'un milieu incliné . Après 48 heures nous y avons prélevé un fragment de gélose que nous avons pressé entre lame et lamelle pour un examen subséquent au microscope .

2- Gélose au riz + tween 80 (37)

On fait bouillir le riz . On filtre puis on ajoute le tween (1 p 100), la gélose (1 p 100) et l'eau distillée. Après autoclavage de 15 minutes à 120 °C, le milieu est coulé en boîte de Pétri où il est ensemencé en stries parallèles qui sont ensuite recouvertes, au centre, d'une lamelle (261). Après incubation de 24 à 48 heures, on presse entre lame et lamelle un fragment de gélose que l'on examine au microscope .

B_/ MILIEU D' ETUDE

Le leucocyanidol précipitant les protéines, il nous a fallu employer un milieu synthétique . Nous avons à cet effet comparé la croissance des différentes souches à étudier sur les trois milieux suivants :

a) Milieu Lodder (157) :

$(NH_4)_2\ SO_4$ ..... 0,5 g

$KH_2\ PO_4$ ..... 0,1 g

$Mg\ SO_4\ 7H_2O$ ..... 0,5 g

Eau du robinet q. s. p. 100 ml

b) Milieu Lodder + biotine, 4 mcg par litre

c) Milieu Yeast Nitrogen Base (Difco) (YNB)

Après autoclavage de 15 minutes à 120°C, on leur ajoute une solution stérile de maltose pour une concentration finale de 2 p 100 .

En milieu Lodder, la croissance est très faible. L'addition de biotine, reconnue par plusieurs comme étant un facteur de croissance essentiel (1, 66, 265) nous a permis d'obtenir une courbe de croissance appréciable sensiblement égale à celle obtenue avec le Yeast Nitrogen Base . Nous avons cependant dû employer ce dernier milieu, les différents mélanges leucocyanidol + cuivre se montrant inactifs en milieu Lodder ou Lodder plus biotine.

Comme source de carbone, nous avons préféré le maltose, ce sucre étant considéré comme supérieur au glucose pour prévenir la formation possible de floculats (68, 69) .

Les souches étudiées sont maintenues sur du YNB maltosé et gélosé à 1,5 p 100 (YNBMG). Elles sont repiquées chaque semaine . Les cultures de 24 heures servant aux différents essais sont obtenues en ensemençant la levure dans 10 ml de YBN maltosé (YNBM) .

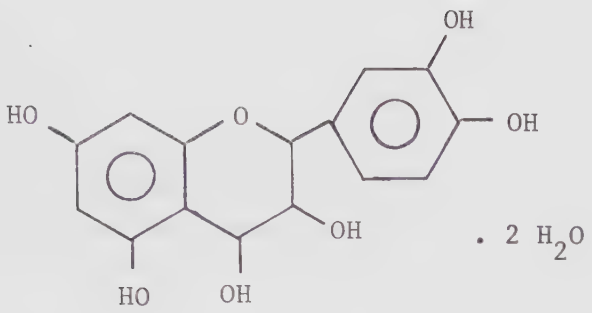
C/ PRODUITS UTILISES .

1°- Cuivre :

C'est du chlorure cuivrique chimiquement pur hydraté à deux molécules d'eau .

2°- Leucocyanidol (LC) :

L'écorce du Pinus maritima est épuisée par de l'eau bouillante . On filtre . Le filtrat obtenu est saturé de chlorure de sodium . Le précipité formé, contenant les formes polymérisées, est éliminé par une seconde filtration . Le surnageant est extrait par de l'acétate d'éthyle . Une fois déshydratée par du sulfate de sodium, la phase organique est additionnée de chloroforme. Les flocons de leucocyanidol qui se forment sont à nouveau redissous dans de l'acétate d'éthyle pur et précipités par le chloroforme . Le précipité obtenu, une fois desséché sur du P_2O_5 , nous a servi dans les essais subséquents . Il répond à la formule suivante : 5, 7, 3'4'-tétrahydroxyflavannediol 3-4, 2 H_2O . Son poids moléculaire est de 342.



Leucocyanidol

Fig. XXII

D_/ ESSAIS PHOTOMETRIQUES PRELIMINAIRES .

Nous avons utilisé le biophotomètre de Bonet-Maury et Jouan . Cet appareil se compose de six flacons placés dans une enceinte thermostatique . Le contenu de chacun d'eux est maintenu homogène par agitation magnétique constante . La première cuve sert de témoin : elle reçoit le milieu ensemencé . Aux cinq autres, on ajoute à ce milieu des doses croissantes de la substance à étudier . La turbidité de chaque flacon est enregistrée automatiquement toutes les deux minutes sur une feuille à graduation arbitraire (On peut trouver une excellente description de cet appareil dans l'ouvrage de LAMBIN et GERMAN (151)-) .

1°- Leucocyanidol :

Les concentrations essayées vont de 0, 05 mM à 20 mM (0, 0017 p 100 à 0, 68 p 100) . La substance ne se montre active que pour des concentrations supérieures à 5 mM. Aux doses inférieures, les courbes de croissance se confondent avec celle du témoin .

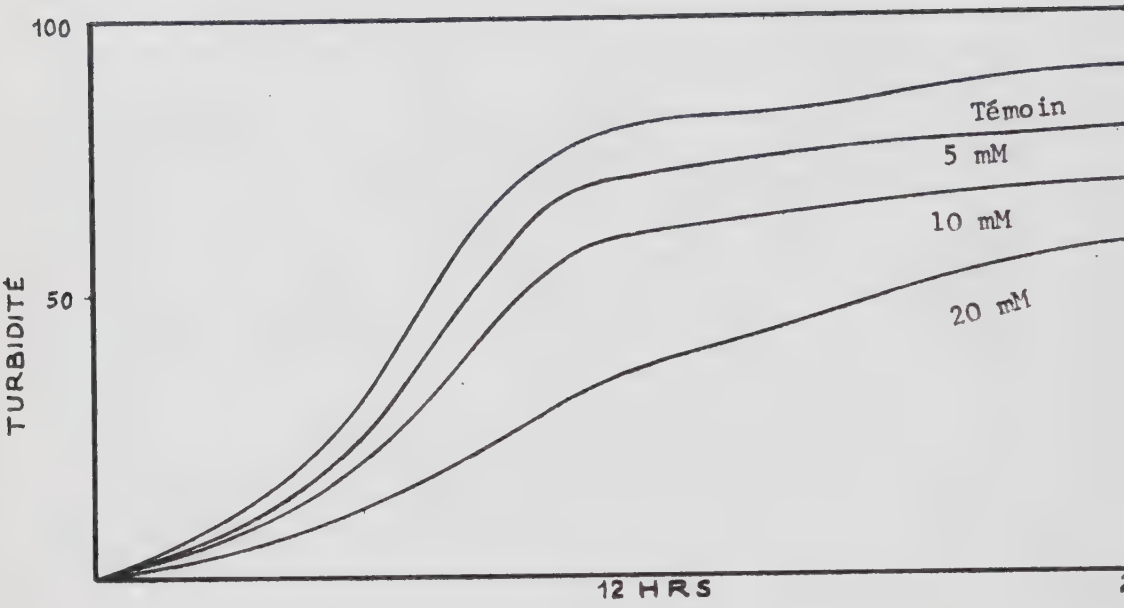


Fig. XXIII

ACTION DU LEUCOCYANIDOL
SUR LA CROISSANCE DE Candida albicans.
Essai photométrique

2°- Leucocyanidol + cuivre :

Il se développe progressivement une coloration brune qui fausse toute lecture photométrique . Nous avons dû, dès lors, utiliser la technique de numération des survivants (57) .

E/ ENUMERATION DES SURVIVANTS .

Protocole :

Chacun des six tubes à essai reçoit 8 ml de YNBM préalablement ensemencé avec une culture de 24 heures de la souche à étudier . Le volume est ensuite complété

à 10 ml avec de l'eau distillée stérile (témoin), une solution de leucocyanidol ou de chlorure de cuivre, ou un mélange des deux .

On laisse 24 heures à 37°C puis on numère les survivants par dilutions décimales en eau distillée stérile . On prélève un ml des dilutions pouvant compter entre 30 et 300 unités vivantes et on mélange soigneusement dans une boîte de Pétri avec 10 ml de YNBMG liquéfié à 45°C.

Résultats :

Partant de l'hypothèse selon laquelle la formation du chélate conditionnait l'activité, nous avons tout d' abord préparé le mélange équimoléculaire . A la dilution 0, 1mM ce mélange n'agit guère plus que le métal seul (tableau V). En revanche, le mélange polyphénol/cuivre de 1 mM/0, 1 mM se montre très candidicide, bien qu'il n'existe alors qu'un atome de cuivre pour dix molécules de leucocyanidol (tableau VI) . Fait encore plus curieux, le mélange flavanne/métal 10 mM/0, 05 mM qui ne renferme plus qu'un atome du métal pour deux cents molécules organiques, est encore fortement fongicide alors qu'à ces concentrations aucun des constituants ne se montre actif pris isolément (tableau VII) . Il est à noter enfin que des proportions métal/flavanne de 1/1000 possèdent encore une certaine activité fongicide puisqu'après 24 heures, nous retrouvons presque trois fois moins de levures qu'au départ (tableau VIII) .

TABLEAU V

ACTION DE MELANGES LEUCOCYANIDOL + CUIVRE SUR CANDIDA ALBICANS - MELANGES 1/1 et 1/2.

Concentrations :	Nombre de levures par ml après 24 h.
Témoin	1 960 000
Cuivre 0,1 mM	280 000
Leucocyanidol 0,1 mM	1 050 000
Leucocyanidol 0,05 mM	1 500 000
LC 0,1 mM + Cu^{++} 0,1 mM	420 000
LC 0,05 mM + Cu^{++} 0,1 mM	410 000

Témoin au départ : 82 000 levures par ml.

TABLEAU VI

ACTION DE MELANGES LEUCOCYANIDOL + CUIVRE SUR CANDIDA ALBICANS - MELANGES 2/1 et 10/1.

Concentrations :	Nombre de levures par ml après 24 h.
Témoin	1 380 000
Cuivre 0,5 mM	140 000
Cuivre 0,1 mM	700 000
Leucocyanidol 1 mM	1 160 000
LC 1 mM + Cu^{++} 0,5 mM	0
LC 1 mM + Cu^{++} 0,1 mM	0

Témoin au départ : 25 000 levures par ml.

TABLEAU VII

ACTION DE MELANGES LEUCOCYANIDOL + CUIVRE
SUR CANDIDA ALBICANS - MELANGES 100/1 et 200/1

Concentrations :	Nombre de levures par ml après 24 h.
Témoin	560 000
Cuivre 0,05 mM	2 800 000
Leucocyanidol 5 mM	1 510 000
Leucocyanidol 10 mM	1 080 000
LC 10 mM + Cu^{++} 0,05 mM	0
LC 5 mM + Cu^{++} 0,05 mM	0

Témoin au départ : 46 000 levures par ml.

TABLEAU VIII

ACTION DE MELANGES LEUCOCYANIDOL + CUIVRE
SUR CANDIDA ALBICANS - MELANGES 1000/1 et 2000/1

Concentrations	Nombre de levures par ml après 24 h.
Témoin	880 000
Cuivre 0,01 mM	640 000
Cuivre 0,005 mM	820 000
Leucocyanidol 10 mM	490 000
LC 10 mM + Cu^{++} 0,01 mM	48 000
LC 10 mM + Cu^{++} 0,005 mM	220 000

Témoin au départ : 123 000 levures par ml.

CHAPITRE IV
MECANISME D'ACTION

°°°

A/ CHELATION : Etude chromatographique .

Les proportions des mélanges actifs étant telles, l'hypothèse du chélate devient difficile à soutenir . En outre, une étude chromatographique ne permet de déceler la formation d'aucun complexe .

Protocole :

Une solution aqueuse de leucocyanidol 10 mM et de chlorure de cuivre 5 mM est abandonnée 24 heures à 37°C. Un prélèvement de 10 µl est ensuite chromatographié en acide acétique à 2 p100, parallèlement à deux témoins dont l'un ne contient que le chromogène et l'autre le métal.

Après séchage, le polyphénol est révélé au chlorure ferrique-ferricyanure de potassium (10) selon une technique mise au point par MICHAUD (199). Un double est trempé dans une solution aqueuse de ferrocyanure de potassium : le cuivre se colore en rouge, le polyphénol n'est pas affecté .

Résultats :

Même mélangés depuis 24 heures, le métal et la molécule organique migrent séparément l'un de l'autre . Le

premier se retrouve à Rf 0,91 et la seconde s'étend en une traînée depuis l'origine jusqu'à des taches situées à des Rf de 0,32 et 0,43 .

B/ ADSORPTION DU LEUCOCYANIDOL EN SURFACE, DIMINUTION DE LA CONCENTRATION LETHALE DU CUIVRE .

Comme le cuivre à des concentrations appropriées est un excellent antifongique (258, 259) et que le flavonoïde , au contraire, ne possède de par sa nature que peu d'action nocive, l'on peut supposer que le métal demeure à l'origine du pouvoir fongicide, mais son action se trouve grandement facilitée par la présence du flavanne .

Mis au contact du sérum sanguin, le leucocyanidol se fixe électivement sur la fraction lipoprotidique (277) . L'on peut penser qu'il agit d'une façon similaire au niveau des lipoprotéines de membrane . Il se constituerait en quelque sorte une voie d'accès hydrophile pour le cuivre dont le passage deviendrait tellement aisé que sa concentration léthale en serait d'autant diminuée .

1°- Essais préliminaires avec des hématies de mouton .

Protocole :

Des hématies de mouton sont lavées à plusieurs reprises jusqu'à obtention d'un surnageant limpide . Elles sont ensuite suspendues dans une solution isotonique de chlorure de sodium contenant du leucocyanidol, 10 mM . On laisse à 37°C en agitant vigoureusement toutes les dix minutes . Après 45 minutes, on centrifuge, on lave à deux reprises puis on suspend ces hématies tannées dans des solutions hypotoniques de NaCl (0,8 à 0,35 p100) .

Résultats :

Les hématies traitées résistent, les témoins s'hémolysent . Nous aurions voulu chiffrer le phénomène, soit en déterminant la densité optique de l'hémoglobine libérée, soit en numérant les érythrocytes non hémolysés à l'aide d'un hématimètre . La chose est cependant impossible .

Sous l'action du tannin les hématies brunissent. Il y a fort probablement réduction du pigment, comme le constate HERZ (111, 112) avec l'acide tannique . Dès lors, le dosage optique doit se faire à 540 nm . Nous n'avons jamais réussi à obtenir des courbes reproductibles à cette longueur d'onde, ni même à 500 nm . Il se pourrait que la préparation de leucocyanidol que nous avons employée,absorbant à ces longueurs d'onde, fausse la lecture photométrique .

D'autre part, nous observons, à la suite d' un examen microscopique, que sous l'influence de la leucoanthocyanne les érythrocytes s'agglutinent en grappes de plusieurs cellules . Le décompte est impossible . Il est cependant aisé de constater que la concentration globulaire ne diminue pas d'une façon aussi marquée que chez les suspensions témoins lorsqu'on les agite en solutions hypotoniques . Chez ces dernières les hématies se raréfient avec le degré d'hypotonicité . Elles ne sont jamais agglutinées en amas comme précédemment .

Commentaires :

Le leucocyanidol semble agir de façon analogue à l'acide tannique, qui lui aussi agglutine les érythrocytes et inhibe l'hémolyse . Il s'agirait uniquement d'un phénomène de surface, la molécule tannante ne pouvant pénétrer à l'intérieur de la cellule (111, 112) . Selon EDELBERG (70) , les groupes polaires du tannin se combineraient aux liaisons peptidiques des protéines de surface . La partie hydrophobe de celles-ci se dirigeant alors vers l'extérieur, il y aurait agglutination .

Les observations de cet auteur puis celles de HUNTER (125) s'accordent mal cependant avec notre hypothèse . Selon eux, la réaction de la molécule tannante avec les protéines superficielles aurait pour effet de diminuer la perméabilité de la membrane aussi bien à l'égard des électrolytes (70) que des non électrolytes (125). Il serait donc plus difficile pour le cuivre de traverser la membrane .

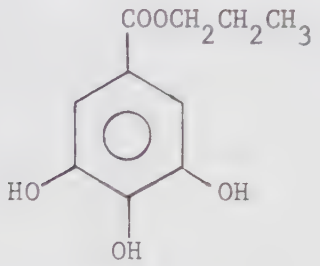
2°- Action du leucocyanidol sur Candida albicans .

Examen microscopique .

Comme les hématies, les cellules de Candida albicans sont agglutinées en amas non numérables . On peut donc penser, dès lors, que le flavanne se fixe en surface.

Il faut souligner à la suite de cette observation que la technique de numération employée ne nous permet pas, en raison de cette agglutination, de chiffrer exactement le nombre de cellules survivant à l'action du tannin . Il nous aurait peut-être été possible de briser ces amas en les soumettant par exemple, à l'action de tensioactifs (89) . Etant donné cependant que ce qui nous intéresse n'est pas l'action du leucocyanidol seul, mais celle du mélange , et que dans les temps choisis il ne subsiste aucune unité vivante, cette mesure apparaît superflue .

3°- Action du gallate de propyle.



Gallate de propyle

Fig. XXIV

Si le leucocyanidol n'agit que par précipitation en surface, on peut espérer obtenir un effet similaire en le remplaçant par une autre molécule susceptible de réagir de la même façon .

Nous avons utilisé à cet effet du gallate de propyle . Le protocole expérimental est identique à celui suivi précédemment pour la numération des survivants .

Les résultats figurent au tableau IX .

(voir tableau IX page suivante)

TABLEAU IX

ACTION DE MELANGES GALLATE DE PROPYLE + CUIVRE SUR CANDIDA ALBICANS

Concentrations :	Nombre de levures par ml après 24 heures
Témoin	1 830 000
Cuivre 0,5 mM	220 000
Gallate 1 mM	3 220 000
Gallate 0,5 mM	3 170 000
Gallate 1 mM + Cu^{++} 0,5 mM	10 600
Gallate 0,5 mM + Cu^{++} 0,5 mM	4 700

Témoin au départ : 285 000 levures par ml.

Bien que l'activité fongicide ne soit pas aussi spectaculaire que précédemment, il n'en existe pas moins une synergie marquée . Il faut cependant noter qu'il se développe progressivement une coloration analogue à celle observée avec les mélanges leucocyanidol + cuivre .

4°- Remplacement du cuivre par un autre métal .

Au cours de tous nos essais, un brunissement progressif nous a semblé corrélatif de l'action fongicide des mélanges étudiés . Nous avons voulu déterminer si cette coloration s'avérait essentielle à l'action candidicide . Pour cela, nous avons remplacé le cuivre par un métal potentiellement toxique mais qui ne provoque pas un changement de coloration sans doute imputable à l'oxydation de la molécule organique (71) .

Nous nous sommes adressé au chlorure de cobalt . Or, les différents mélanges leucocyanidol + cobalt ne se sont guère montrés plus toxiques que le métal seul .

Il semble donc, à la suite de cette observation qu'il faille modifier notre première hypothèse . Certes, le tannin se fixe bien en surface, mais il semble que les propriétés oxydantes du métal soient plus déterminantes que son activité levuricide propre .

C_/ OXYDATION DU LEUCOCYANIDOL PAR LE CUIVRE - PRODUCTION DE COMPOSES TOXIQUES .

1°- Introduction .

Le cuivre joue un rôle essentiel dans l'oxydation des polyphénols . Toutes les polyphénoloxydases en sont pourvues (29) . Le métal y constitue le centre actif.

Après dénaturation d'une préparation enzymatique par extraction avec une solution de cyanure de potassium, KERTESZ (138) lui restaure toute son activité phénoloxydasique par simple addition d'ions cuivriques . De même, HARRISON et PIERPOINT (100) rétablissent l'activité de la polyphénoloxydase de la feuille de tabac inactivée par du diéthyldithiocarbamate de sodium ou de l'éthylxanthate de potassium en lui ajoutant des ions cuivriques. KARKHANIS et FRIEDEN (136) isolent de différents champignons une protéine possédant des propriétés inhibitrices sur la tyrosinase de même source . Par addition d' ions cuivriques à cette même protéine en proportions similaires à la concentration métallique de l'enzyme, ils obtiennent une préparation enzymatique très active . Il s'agirait selon les auteurs d'un apoenzyme qui inhiberait l'holoenzyme par compétition au niveau des centres actifs constitués par les ions cuivriques . Par addition de ceux-ci, la compétition cesse et la protéine inhibitrice acquiert des propriétés oxydantes .

Même sous forme ionique, le cuivre accélère l'oxydation des polyphénols . Selon FOSTER (77) la mélanogénèse pourrait avoir lieu en l'absence de tout enzyme, les ions cuivriques pouvant non seulement oxyder la 3-4 dihydroxyphénylalanine ou DOPA (diphénol) mais aussi la tyrosine (monophénol) . Cette dernière oxydation requiert cependant une concentration minimum en DOPA . S'oxydant en dopaquinone sous l'influence des ions cuivriques, elle serait nécessaire à l'hydroxylation de la tyrosine (95) . La réaction pourrait se schématiser comme l'indique la figure XXV .

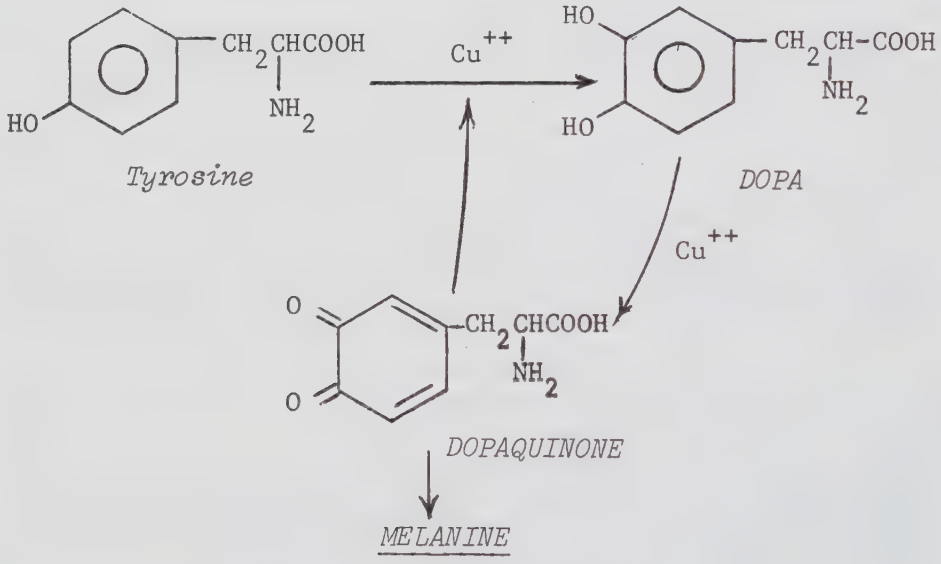


Fig. XXV

MELANOGENESE NON ENZYMATIQUE

BHAGVAT et RICHTER (25) puis PIERPOINT et HARRISON (222) rapportent des résultats d'études manométriques montrant le rôle accélérateur du cuivre sur l'oxydation de différents composés phénoliques . Ces résultats figurent aux tableaux X et XI .

Il faut remarquer l'action oxydante sur la (+) catéchine, cette dernière ressemblant à un hydroxyle près au leucocyanidol . DOURMICHIDZE (63) affirme , pour sa part, que l'autooxydation de la (+) catéchine est quatre fois plus rapide en présence d'ions cuivriques .

TABLEAU X

OXYDATION DE POLYPHENOLS PAR LE CUIVRE. ETUDE MANOMETRIQUE

Substrats	µl d'oxygène absorbés/heure	
	Témoins	avec Cu^{++}
Catéchol	2	45
Homocatéchol	34	238
Adrénaline	6	115
Gaïacol	0	0
Acide protocatéchique	2	0
Pyrogallol	82	115
Phloroglucinol	0	3
p-Crésol	0	0
Quinol	4	18
p-Phénylènediamine	0	198

Chaque fiole de Warburg contient 0,2 mg du métal (omis chez les témoins) dissous dans 2 ml de tampon phosphate M/15 à pH 7 et 0,2 ml de substrat M/4. Transcription partielle de résultats publiés par BHAGVAT et RICHTER (25).

TABLEAU XI

OXYDATION DE POLYPHENOLS PAR LE CUIVRE
ETUDE MANOMETRIQUE

Substrats	Absorption d'oxygène	
	Témoins	avec Cu^{++}
Acide caféique	3	10
Catéchol	3	11
(+) Catéchine	0	13
Acide gallique	10	39
Quercétol	3	4
Rutine	-	0
1-Tyrosine	0	0

Absorption d'oxygène : µl par 30 minutes.
Appareil utilisé : Warburg. Concentrations : substrats, 3,2 mM ; sulfate de cuivre, 0,36 mM ; tampon tris (pH 7), 70 mM. Le volume final est de 2,8 ml.
Transcription partielle de résultats publiés par PIERPOINT et HARRISON (222).

KIESER, POLLARD et TIMBERLAKE (139, 278) rendent le cuivre responsable des précipités observés dans les jus de pommes . Selon eux les ions métalliques catalyseraient l'oxydation des substances phénoliques des jus, en particulier les leucoanthocyannes et les catéchines, qui précipiteraient , entraînant avec eux différentes molécules telles qu'acides aminés et protéines .

De même, MASQUELIER et ROUX (196, 239) recommandent que dans la préparation des médicaments contenant des leucoanthocyannes, on évite tout contact avec les métaux, et principalement le cuivre, ce dernier étant susceptible de hâter considérablement la polymérisation des anthocyanogènes .

L'oxydation des polyphénols, qu'elle soit enzymatique ou non, s'accompagne de l'apparition d'une coloration dont l'intensité s'accroît progressivement . Elle correspond à la formation de polymères à poids moléculaires élevés . Le brunissement observé chez les végétaux à la suite d'un traumatisme d'origine microbienne ou mécanique est un exemple universellement connu de ce phénomène oxydatif (53, 72, 147, 148, 279, 280) .

A la suite des expériences précédentes, il semble bien que le métal ne soit pas à la base de la forte action candidicide . Comme celle-ci s'est toujours manifestée conjointement à l'apparition d'un brunissement progressif, l'on peut supposer, en se fondant sur les affirmations et les résultats obtenus par les différents auteurs que nous venons de citer, que le métal n'agit que comme catalyseur de l'oxydation de la molécule organique . Reste maintenant à déterminer les modalités d'action .

2°- Produits bruns :

Il existe dans la littérature de nombreux exemples où les polyphénols ne deviennent inhibiteurs qu'après avoir été oxydés en des polymères à poids moléculaires élevés (61, 62, 211, 254) .

En milieu Lodder, le mélange leucocyanidol+ cuivre n'est doué que de peu d'activité . Parallèlement, le brunissement est de faible intensité . Il paraît donc vraisemblable que les produits colorés formés en YNBM soient responsables de l'action fongicide .

Protocole :

Dix ml de YNBM contenant du leucocyanidol (1 mM) et du chlorure de cuivre (0, 1 mM) sont abandonnés à 37°C pendant 24 heures, c'est-à-dire, jusqu'au moment où la coloration nous paraît avoir atteint son maximum . On ajoute alors 0, 1 ml d'une culture de 24 heures de Candida albicans et on laisse à nouveau dans l'enceinte thermostatée . Le lendemain, on dénombre les survivants par dilutions décimales .

Résultats :

Nous avons répété cette expérience à plusieurs reprises, obtenant à chaque fois des résultats similaires . Nous reproduisons au tableau XII les données de l'un de ces essais .

TABLEAU XII

ACTION DES PRODUITS BRUNS SUR CANDIDA ALBICANS

Concentrations :	Nombre de levures par ml 24 heures après l'ensemencement
Témoin	908 000
LC 1 mM + Cu^{++} 0,1 mM	99 000

Témoin au départ : 108 000 levures par ml.

Même s'ils sont doués d'une certaine activité bactériostatique, on ne peut imputer à ces produits bruns la très forte action levuricide observée précédemment .

Le brunissement ne semble donc qu'un épiphénomène, l'antibiose ayant lieu, semble-t-il, avant qu'il n'atteigne son maximum .

Bien qu'en désaccord avec les différentes observations puisées dans la littérature et citées précédemment, ces résultats n'en confirment pas moins certains autres . Ainsi, le thé noir, résultant de l'oxydation des polyphénols de la feuille de thé (26, 235) se montre moins antibiotique que le thé vert (54) où les composés phénoliques n'ont pas subi d'oxydation . Etudiant les effets de l'oxydation sur l'inhibition enzymatique par certains polyphénols, LYR (164) constate qu'une oxydation trop poussée, produisant des polymères à poids moléculaires élevés, rend le polyphénol tout à fait inefficace .

3°- Temps nécessaire à l'action antibiotique en YNBM .

Les mélanges leucocyanidol + cuivre ayant perdu en 24 heures presque tout leur pouvoir levuricide, il nous faut maintenant déterminer à quel moment se situe cette activité .

Protocole :

Nous avons répété les mêmes expériences que celles du chapitre III mais en numérant ces fois-ci après 60 puis 90 minutes .

Résultats :

Ils figurent au tableau XIII . On peut y voir que l'action est relativement rapide . Il est à noter qu'après 90 minutes, la coloration des solutions leucocyanidol + cuivre n'est guère changée, ce qui prouve une fois de plus que l'antibiose ne peut être imputée aux polymères à poids moléculaires élevés .

TABLEAU XIII

TEMPS NECESSAIRE A L'ACTION DU MELANGE LEUCOCYANIDOL + CUIVRE EN YNBM

Concentrations :	Nombre de levures par ml après :		
	60 minutes	90 minutes	24 heures
LC 1 mM + Cu^{++} 0,1 mM	850	280	0
LC 10 mM + Cu^{++} 0,05 mM	100	0	0

Témoin au départ : 34 000 levures par ml.

4°- Essais en milieu aqueux .

Après avoir déterminé le temps nécessaire à l'action, nous avons procédé à différents essais afin d'élucider le mécanisme de l'action antibiotique . Certains de ceux-ci ont cependant été effectués avant même que nous ayons défini le rôle essentiel de la concentration en ions hydrogène . Néanmoins, nous reproduisons ici deux d'entre eux , car nous croyons qu'ils apportent des arguments valables dans l'étude du mécanisme d'action :

a) Transformation du leucocyanidol par le cuivre : preuve spectrale .

Pour déterminer si le métal peut transformer en si peu de temps la molécule organique d'une façon notable et déceler la nature du changement produit, il faut, après les avoir laissés en contact pendant un temps déterminé, les séparer puis tenter de découvrir la nature des modifications dans les propriétés du flavonoïde .

Prenant avantage du fait que les deux produits migrent de façons différentes en acide acétique à 2 p 100 nous avons utilisé la chromatographie ascendante sur papier pour les séparer . Une fois éluée, la traînée de leucocyanidol est soumise à une étude spectrale .

Protocole :

Une solution aqueuse de leucocyanidol 10 mM et de chlorure de cuivre 0,5 mM est abandonnée à 37°C. On fait de même avec une solution témoin ne contenant que le chromogène . Après 90 minutes, un prélèvement de 10 µl de chacune des solutions est chromatographié en acide acétique à 2 p 100, puis chaque traînée, après localisation sous U. V. , est éluée par de l'alcool à 96 p 100 redistillé. Les deux solutions sont ensuite soumises à une lecture spectrale allant de 240 à 450 nm .

Résultats :

Ils sont inscrits en figure XXVI. Le minimum observé à 255 nm avec les solutions alcooliques extemporanées du chromogène (voir chapitre II) a complètement disparu lorsque le leucocyanidol a été préalablement mélangé aux ions cuivriques en milieu aqueux . Avec la leucoanthocyanne seule, la baisse de la densité optique à cette longueur d'onde, quoiqu'existant encore, n'en est pas moins sensiblement atténuée .

Il semblerait donc que le passage du flavanne en solution aqueuse amène un changement analogue, qu'il soit ou non accompagné d'ions métalliques, la présence de ceux-ci semblant toutefois accélérer considérablement le phénomène . Autrement dit , le cuivre aurait essentiellement un rôle catalytique dans ce que qu'on peut penser être une réaction d'oxydation de la molécule organique .

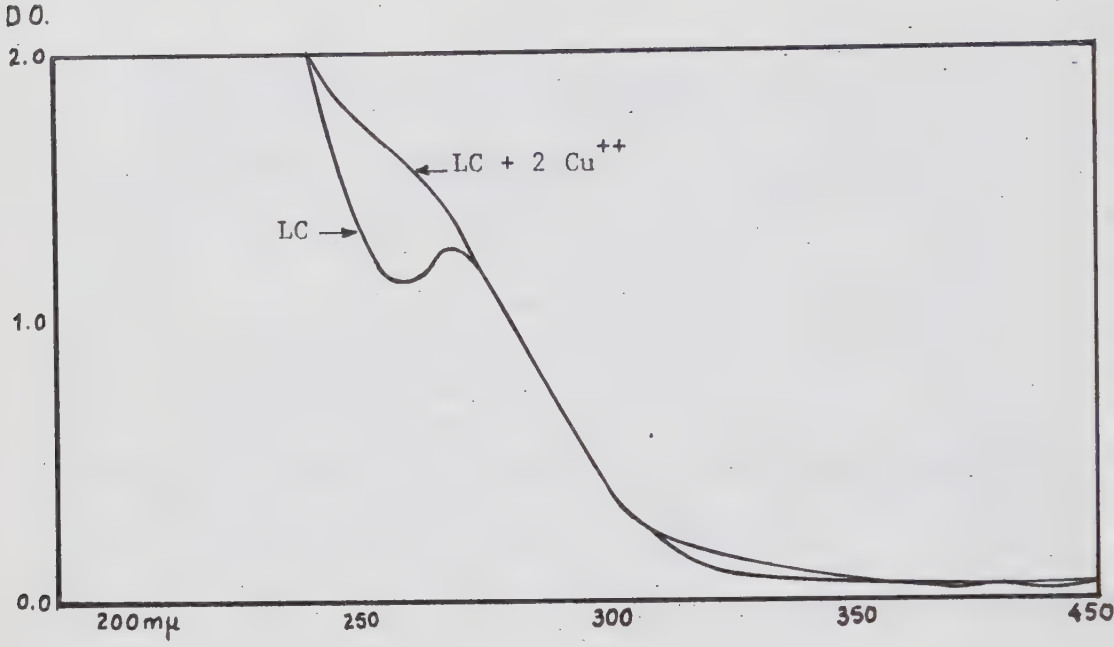


Fig. XXVI

SPECTRE U.V. DES PRODUITS D'ELUTION DU LEUCOCYANIDOL SEUL (LC) ET D'UN MELANGE LEUCOCYANIDOL + CUIVRE (LC + Cu^{++})

b) Influence du cuivre sur la fixation du leucocyanidol en surface .

Il s'agit de déterminer si la présence du cuivre, entraîne une meilleure fixation à la surface des levures . Si tel était le cas, l'on pourrait conclure que c'est le chromogène qui, une fois modifié par le métal , constitue la molécule toxique du mélange .

Les manipulations pouvant être la cause d'une dissémination, nous avons utilisé pour cet essai une levure ne présentant aucun pouvoir pathogène, mais pouvant, par ailleurs, satisfaire au but de l'expérience .

Protocole :

L'on recueille à l'aide d'eau distillée stérile une culture de Saccharomyces cerevisiae étalée depuis près de 48 heures sur une gélose au malt . On lave à trois reprises puis l'on divise la suspension obtenue en deux parties égales . A l'une d'elles, on ajoute du leucocyanidol, et à l'autre, du leucocyanidol et du cuivre pour des concentrations finales de 10 mM et 0,1 mM respectivement .

On laisse reposer trois heures à 37°C en agitant vigoureusement toutes les quinze minutes, après quoi, on centrifuge . Les deux culots sont ensuite lavés à deux reprises avec de l'eau distillée stérile puis suspendus dans de l'acide chlorhydrique 2 N. On abandonne au bain-marie bouillant pendant 45 minutes .

Après refroidissement, on fait passer la coloration produite dans l'alcool isoamylique que l'on déshydrate au sulfate de sodium . On centrifuge . La densité optique est déterminée à 540 nm :

- leucocyanidol seul : 0,66
- leucocyanidol + cuivre : 0,86

Cette méthode de dosage est essentiellement basée sur celle mise au point par TAYEAU, MASQUELIER et LEFEVRE (276) .

Commentaires :

L'expérience confirme bien, comme le prétend PERI (218), que les levures fixent les leucoanthocyannes . La plus grande quantité de cyanidol produite de la suspension traitée par ce mélange chromogène-métal peut-être due à l'un ou aux deux faits suivants :

1- Le flavanne s'est fixé en plus grande quantité .

2- La quantité fixée est la même dans les deux cas . Cependant, transformé par le cuivre, le flavonoïde se fixe plus fortement , il est mieux retenu .

MILISAVLJEVIC (202) fait remarquer que les levures mortes adsorbent beaucoup mieux les tannins que les cellules vivantes . On peut donc penser que les cellules soumises à l'action du mélange adsorbent mieux parce qu'elles sont tuées . Ceci ne peut être totalement vrai puisqu'en milieu aqueux le mélange se montre peu actif .

5°- Influence du pH .

En milieux aqueux ou Lodder, l'action candidicide des mélanges leucocyanidol+cuivre est négligeable aux concentrations utilisées en YNBM (1 mM + 0, 1 mM) . Il semble donc, dès lors, que le milieu synthétique fournisse un troisième élément essentiel à l'action . A la suite des observations de CLARK et coll (42), il nous est paru possible qu'il puisse s'agir d'un ou des acides aminés contenus dans ce milieu. Nous n'avons cependant observé aucune synergie .

Stérilisé par filtration le YNBM ne donne lieu à aucune activité fongicide . Ce sont donc les transformations apportées par le chauffage qui sont déterminantes . L'une des conséquences les plus facilement notable de l'autoclavage consiste en une diminution de la concentration en ions hydrogène le pH primitivement à 3, 6 passe de 5, 9 à 6, 4 selon le degré et la durée du chauffage .

Afin de déterminer toute l'importance des variations de pH, nous avons préparé diverses solutions tampon allant de pH 1 à 10, à base de chlorure de potassium, de phtalate acide de potassium, de phosphate acide de potassium et d'acide borique, aux mêmes concentrations que celles préconisées par CLARK (voir COHEN (45)-) .

Après addition de leucocyanidol et de cuivre (1 mM et 0, 1 mM respectivement) nous avons observé les changements de coloration .

La rapidité d'apparition et d'intensité de la coloration augmentent avec la diminution en ions hydrogène. En milieu acide, de pH égal ou inférieur à 5, elle est peu

prononcée, même en 24 heures . En milieu alcalin, elle atteint une intensité maximale d'autant plus rapidement que le pH est élevé .

Nous avons par la suite utilisé ces mêmes tampons (phtalate et phosphate) à des pH allant de 5 à 9 pour déterminer une possible activité antibiotique du mélange leucocyanidol + cuivre (1 mM + 0, 1 mM) . Les résultats furent négatifs .

La concentration en tampon pouvant constituer un facteur décisif, nous l'avons abaissé dans le cas du phosphate de 50 mM (CLARK) à 7 mM (YNBM), et dans celui du phtalate de 50 mM à 5 mM . Ces solutions sont ensuites amenées aux pH désirés par ajouts d'une solution centinormale d'hydroxyde de sodium .

a) Essais en tampon phosphate (7 mM) .

Protocole :

Chacun des tubes à essai reçoit 7 ml d'une solution stérile tamponnée à un pH particulier . Nous leur ajoutons 1 ml d'une solution de leucocyanidol et 1 ml d'une solution de chlorure de cuivre pour des concentrations finales de 1 mM et 0, 1 mM . Chaque tube est immédiatement ensemencé avec un ml d'une dilution décimale d'une culture de 24 heures de Candida albicans . Un témoin en eau distillée stérile sert de référence .

Résultats :

Ils figurent aux tableaux XIV et XV . Nous avons répété cette même expérience à plusieurs reprises sans toutefois parvenir à obtenir un pH optimum,. les différentes variations obtenues entre pH 5, 5 et 7 ne nous paraissant pas significatives . Il semble plutôt s'établir un plateau , un intervalle de pH à l'intérieur duquel l'action s'équivaut, et en dehors duquel il ne subsiste que peu ou pas d'activité .

TABLEAU XIV

INFLUENCE DU pH SUR L'ACTIVITE FONGICIDE DU MELANGE LEUCOCYANIDOL + CUIVRE (1 mM + 0,1 mM).

pH Tampon phosphate, 7 mM	Nombre de survivants dans un ml d'une dilution décimale effectuée 45 minutes après l'ensemencement
4,5	∞ (*)
5,0	∞
5,5	82
6,0	51
6,5	92
7,0	31
7,5	165
8,0	∞
8,5	∞

Témoin au départ : 47 000 levures viables par ml.
(*) impossibilité de dénombrer : colonies confluentes.

TABLEAU XV

INFLUENCE DU pH SUR L'ACTIVITE FONGICIDE DU MELANGE LEUCOCYANIDOL + CUIVRE (1 mM + 0,1 mM)

pH, tampon phosphate, 7 mM	Nombre de levures dans un ml d'une dilution décimale effectuée après :	
	60 minutes	90 minutes
5,8	0	0
6,0	0	0
6,2	6	0
6,6	2	0
7,0	13	6

Témoin au départ : 55 000 levures par ml.

b) Essais en tampon phtalate, 5 mM

Parallèlement au phosphate, ce tampon , à 50 mM par ml, empêche toute action toxique des mélanges leucocyanidol + cuivre . Si cependant se concentration est abaissée à un g par litre (5 mM) l'antibiose semble identique à celle observée en milieu phosphate .

Nous rapportons au tableau XVI les résultats d'un essai effectué avec ce tampon .

La haute température atteinte pendant l'autoclavage pouvant transformer les tampons et par suite modifier le pH , nous avons cru bon de procéder à une vérification . Seuls les lots dont le pH était resté stationnaire ont été employés pour les essais antibiotiques .

TABLEAU XVI

INFLUENCE DU pH SUR L'ACTIVITE FONGICIDE DU MELANGE LEUCOCYANIDOL + CUIVRE. ESSAI EN TAMPON PHTALATE

pH tampon phtalate, 5 mM	Nombre de survivants dans un ml d'une dilution décimale effectuée 60 minutes après l'ensemencement
4	∞ *
5	∞
6	0

Témoin au départ : 70 000 levures par ml.

* Impossibilité de dénombrer : colonies confluentes.

6°- Temps de contact et activité .

Protocole :

Nous préparons neuf tubes contenant tous les mêmes concentrations de leucocyanidol et de cuivre (1 mM et 0,1 mM) en tampon phosphate (7 mM) de pH 6. A 0 heure, nous ajoutons au tube n°1, 0,1 ml d'une culture de 24 heures de Candida albicans . Après 45 minutes, nous mélangeons dans trois boîtes de Pétri 1 ml des dilutions 1/10, 1/100, 1/1000 de ce premier tube à 10 ml de YNBMG liquéfié à 45°C . A une heure, nous répétons avec le tube n°2, et ainsi de suite, d'heure en heure, jusqu'au tube n°9 .

Résultats :

Les résultats obtenus figurent au tableau XVII. L'action antibiotique maximum au début, s'amenuise peu à peu , le produit brun formé après 24 heures ayant perdu toute activité comme l'a montré une expérience précédente . Il semble donc que le cuivre active les molécules du flavanne qui réagissent ensuite entre elles, c'est-à-dire se polymérisent, les formes trop polymérisées n'étant plus actives .

TABLEAU XVII

TEMPS DE CONTACT LEUCOCYANIDOL + CUIVRE ET ACTIVITE FONGICIDE

Temps de contact LC + Cu^{++} avant l'addition de C.albicans	Nombre de survivants par ml 45 minutes après l'addition de la levure
0 heure	0
1 heure	30
2 heures	620
3 heures	870
4 heures	560
5 heures	1 160
6 heures	-
7 heures	4 300
8 heures	1 800

Témoin au départ : 44 000 levures par ml

7°- Polymérisation du leucocyanidol par le cuivre . Preuve chromatographique .

Dans des études chromatographiques préliminaires, nous avions préparé diverses solutions aqueuses non tamponnées de leucocyanidol + cuivre . Après des temps de contact déterminés une portion était prélevée pour chromatographie ascendante sur papier en acide acétique à 2 p 100 . Aucun changement n'était perceptible visuellement . Seule une étude spectrale nous avait permis de déceler une transformation de la molécule organique. Répétant ces mêmes expériences sur gel de silice, employant comme solvant l'association benzène/acide acétique/eau en proportions 10 : 10 : 1 , nous avons obtenu des résultats analogues .

Conscient de l'influence du pH sur la réaction de condensation, nous avons par la suite utilisé des solutions tamponnées au même pH que celui employé pour la détermination de l'action antibiotique . Nous avons , dès ce moment , obtenu des résultats significatifs .

Protocole :

Nous préparons en tampon phosphate (7 mM) de pH 6, les trois solutions suivantes :

1- Leucocyanidol 5 mM

2- $CuCl_2 . 2H_2O$ 0,5 mM

3- Leucocyanidol 5 mM + $CuCl_2 . 2H_2O$: 0,5 mM

On laisse deux heures à 37°C puis on dépose 10 µl de chaque solution à la base d'un chromatogramme que l'on suspend dans une solution tamponnée comme précédemment .

Une fois développé , le papier est séché, puis le polyphénol est révélé par trempages successifs dans des solutions de chlorure ferrique puis de ferricyanure de potassium : le flavanne se colore en bleu .

Résultats :

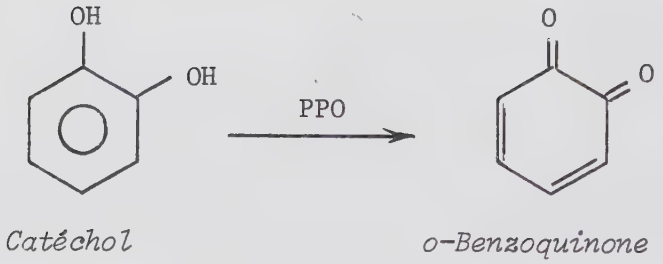
Avec le témoin leucocyanidol, nous retrouvons les deux spots habituels précédés d'une traînée . Si cependant le polyphénol a été préalablement soumis à l'action des ions cuivriques, un dépôt demeure à l'origine . Il correspond selon FORSYTH (75, 76) et ROBERTS (233, 235) aux formes hautement polymérisées qui, en raison de leurs structures tri-dimensionnelles fort complexes, ne peuvent migrer sur le papier (105) .

8°- Nature des composés intermédiaires .

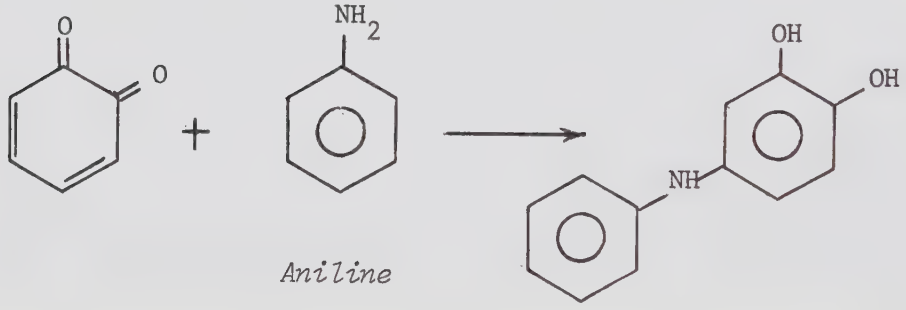
Dans le processus d'oxydation des polyphénols, les produits intermédiaires sont en général des formes instables hautement réactives . Elles s'additionnent facilement à certaines molécules pour donner des composés caractéristiques . Nous avons voulu déterminer s'il apparaissait de telles formes pendant l'oxydation non-enzymatique du leucocyanidol par le cuivre .

a) Réaction avec l'aniline :

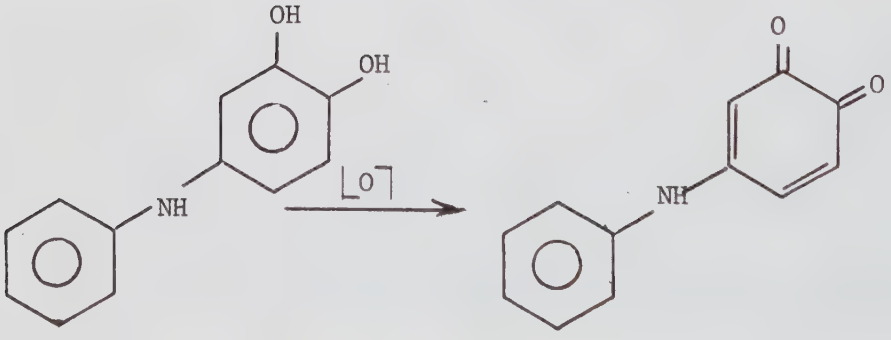
Incapables d'isoler à l'état pur les formes quinoniques très instables produites par l'action de la tyrosinase sur le catéchol , PUGH et RAPER (226) réussissent à les soustraire au milieu réactionnel en leur ajoutant de l'aniline . Ils isolent, par précipitation, un produit d'addition dont les propriétés sont en tous points identiques à celles du composé obtenu par addition d'aniline à une solution d'o-benzo-quinone préparée par synthèse en milieu éthéré . L'analyse élémentaire permet de supposer la formation d'une dianilino-o-benzoquinone .



Catéchol *o-Benzoquinone*



Aniline



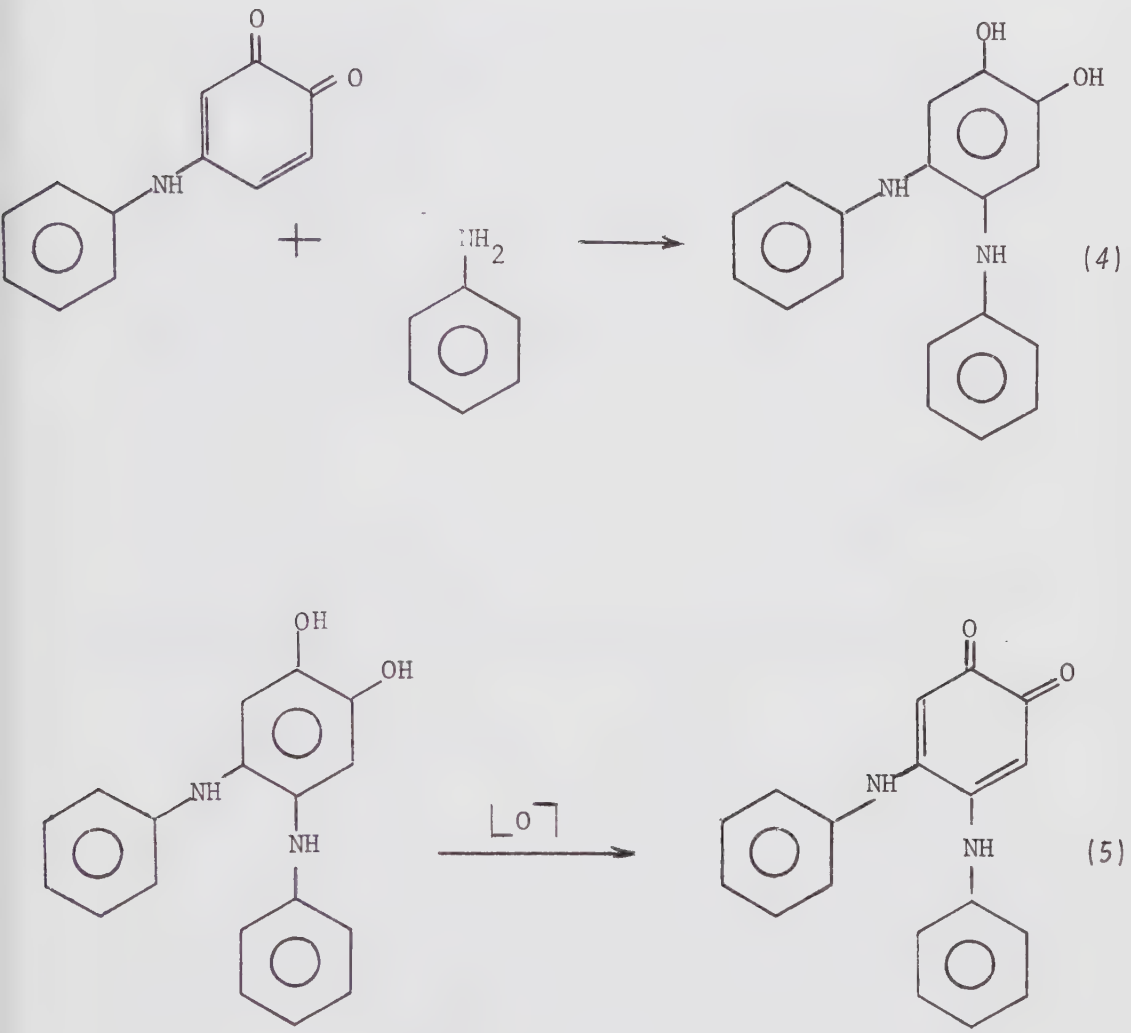


Fig. XXVII

REACTION DE L'ANILINE AVEC L'O-BENZOQUINONE

LAMB et SREERANGACHAR (150) essayant d'isoler un produit d'addition analogue avec la catéchine ne parviennent pas à obtenir, par précipitation puis purifications subséquentes, une quantité suffisante de cristaux pour leur permettre une analyse élémentaire .

Nous avons voulu savoir s'il se formait au cours de l'oxydation du leucocyanidol par le cuivre des produits susceptibles de réagir avec l'aniline et de déterminer, en autant que cela puisse se faire, la nature de la réaction . Ces formes hautement réactives pourraient être précisément les produits responsables de la forte action levuricide .

Protocole :

On prépare une solution de leucocyanidol 10 mM et de chlorure de cuivre 0, 5 mM en tampon phosphate de pH 6 . Après dix minutes de contact, on ajoute de l'aniline pour une concentration finale de 1 p 100 v/v . Il se produit rapidement une coloration rouge foncé . PIERPOINT (219) observe une telle coloration par addition d'aniline à une solution d'acide chlorogénique oxydé par la polyphénoloxydase de la feuille de tabac . Il l'attribue à la formation d'une dianilinochlorogénoquinone .

On abandonne à 37°C pendant 48 heures . Le précipité brun-noir est recueilli par centrifugation, lavé à deux reprises avec de l'eau distillée, puis à l'éther , pour se débarrasser de toute trace de leucoanthocyanne ou d'aniline . Il est ensuite facilement dissous dans une faible quantité d'acétone puis un volume de 10 µl est prélevé pour une chromatographie ascendante en butanol : acide acétique : eau (B. A. W.) 4 : 1 : 2, 2 .

Résultats :

Il migre en une longue traînée brune allant de Rf 0, 26 jusqu'au front avec de légères augmentations d'intensité à Rf 0, 42 et 0, 71 . Le flavanne seul forme une légère tache à 0, 66 et une autre plus importante à 0, 42 précédée cette fois-ci d'une traînée depuis l'origine . L'aniline migre en un seul spot bien défini à 0, 71 .

Avec le réactif de Barton, la traînée brune se colore en bleu, ce qui laisse supposer des propriétés réductrices . Elle n'est cependant nullement affectée par le réactif d'Ehrlich (p-diméthylaminobenzaldéhyde) ni par l'acide p-toluènesulfonique . Le premier colore le leucocyanidol en rose pâle et l'amine aromatique en jaune vif tandis que le second révèle le flavonoïde en rose (238) .

Ces réactifs ne nous ayant pas permis de déceler la composition du précipité, nous avons soumis la solution acétonique à l'hydrolyse . Après acidification à l'acide chlorhydrique, on chauffe au bain-marie bouillant pendant 40 minutes . Il se développe rapidement une coloration rouge . On fait passer en alcool isoamylique, puis on soumet à la chromatographie ascendante sur papier dans du Forestal (eau-acide acétique-HCl, 10 : 30 : 3) parallèlement à des témoins cyanidol et aniline .

Il se forme deux taches dont l'une correspond exactement au témoin cyanidol, et l'autre, après révélation au diméthylaminobenzaldéhyde, à l'aniline .

Commentaires :

L'on peut donc conclure, à la suite de ce résultat, que le précipité brun foncé formé en présence du mélange leucocyanidol + cuivre + aniline est un produit d'addition contenant du leucocyanidol et de l'aniline . On peut aussi penser que le groupement amine de l'aniline participe à la réaction d'addition puisqu'il est impossible de colorer le précipité par le réactif d'Erlich .

Ces résultats, similaires à ceux de PUGH et RAPER (226) avec l'o-benzoquinone, de LAMB et SREERANGACHAR (150) avec la catéchine et de PIERPOINT (222) avec l'acide chlorogénique laissent supposer la formation d'intermédiaires à structure quinonique ou analogue, hautement réactive (32) .

b) Réaction avec les acides aminés .

Les quinones formées par l'action d'une polyphénoloxydase sur un polyphénol quelconque réagissent avec les acides aminés primaires ou secondaires (17,131) pour donner des produits d'addition doués d'une intense coloration caractéristique (220) . Selon une étude récente du spectre de résonance électro-paramagnétique, cette addition se ferait sur le carbone six, du moins dans le cas de l'acide chlorogénique (133). La réaction pourrait se schématiser de la façon suivante :

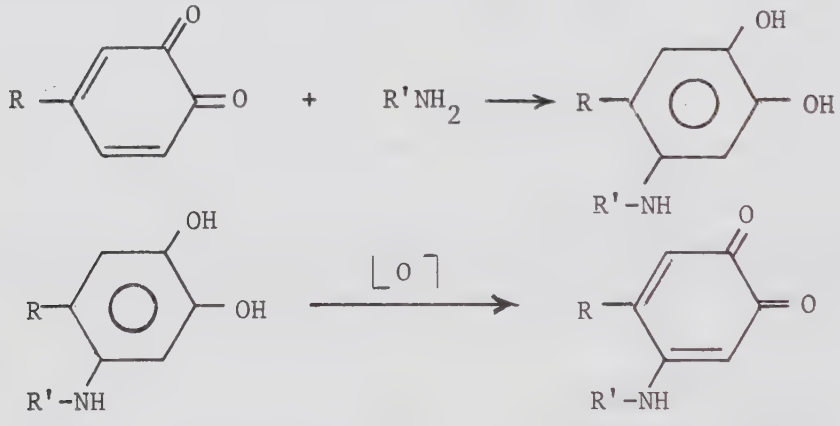


Fig. XXVIII

REACTION D'ADDITION QUINONE-ACIDE AMINE

Répétant ces mêmes expériences avec le leucocyanidol, mais n'employant cette fois-ci, comme molécule oxydante, que des ions cuivriques et comme acide aminé, la glycine, nous avons obtenu peu après l'addition de cette dernière une intense coloration brune indiquant , tout au moins une réaction entre cet acide et le ou les produits d'oxydation du flavonoïde . .

c) Réaction avec la cystéine .

Les composés à groupement sulfhydryl réagissent avec les formes quinoniques pour donner des composés d'addition incolores et très stables (110, 120, 284, 285) . Ils bloquent ainsi toute polymérisation . La réaction pourrait se schématiser de la façon suivante :

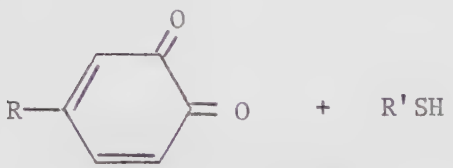
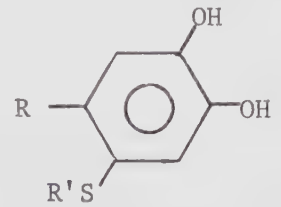


Fig. XXIX



Produit d'addition incolore

Nous avons vérifié chromatographiquement qu'une addition de cystéine ou de glutathion en excès (4 molécules pour une de flavanne), à une solution tamponnée de leucocyanidol + cuivre empêche toute polymérisation . Nos essais ont porté sur une période de vingt jours .

Cependant, comme ces composés réagissent aussi avec les métaux lourds, dont le cuivre, pour donner des chélates stables, il est fort possible que l'inhibition de la polymérisation provienne, en partie du moins, d'une réaction cuivre-thiol . Il ne nous est pas paru essentiel dans le cadre de notre travail de pousser plus loin nos investigations en ce domaine .

9°- Extraction du cuivre .

Il se peut fort bien que les produits actifs soient, non pas des formes quinoniques, mais des polymères intermédiaires, de structure phénolique, ayant des dimensions optimum pour la précipitation des enzymes et des protéines de surface (164) .

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons préparé des solutions tamponnées de leucocyanidol + cuivre . Après des temps de contact déterminés, nous en avons extrait le métal . Il semble que la majorité sinon la totalité des formes quinoniques puissent être éliminées par un tel procédé (210) .

Protocole :

a) Essai antibiotique :

Nous préparons trois solutions de leucocyanidol + cuivre en tampon phosphate (7 mM) de pH 6 . Après une heure à 37°, nous extrayons le cuivre de l'une d'elles selon la technique décrite plus bas, puis nous l'ensemençons avec une dilution décimale d'une culture de 24 heures de Candida albicans . Les mêmes opérations sont répétées après 2 puis 3 heures avec les deux autres tubes . Soixante minutes après chaque ensemencement , un ml d'une dilution décimale est mélangé en boîte de Pétri avec 10 ml de YNBMG refroidi à 45°C . On dénombre après 48 puis 72 heures .

On renouvelle cet essai avec trois autres solutions tamponnées de leucocyanidol + cuivre, en omettant toutefois l'extraction du métal .

b) Procédé d'extraction du cuivre .

La technique consiste à agiter la solution de leucocyanidol + cuivre avec une phase organique immiscible contenant un agent chélateur du métal insoluble dans l'eau (87) .

A 10 ml de la solution tamponnée de leucocyanidol + cuivre , nous ajoutons 5 ml d'une solution de diphénylthiocarbazone à 0,25 p 100 dans du tétrachlorure de carbone . Après dix minutes d'agitation mécanique soutenue, on laisse reposer jusqu'à séparation complète des deux phases . On décante la partie organique . Afin de se débarrasser de toute trace de diphénylthiocarbazone, la même opération est répétée à plusieurs reprises, mais

en n'utilisant ces fois-ci que le solvant . La solution ainsi privée de son cuivre est ensemencée selon le protocole décrit plus haut .

Résultats :

La solution de leucocyanidol privée de son cuivre après une, deux ou trois heures de contact perd toute activité antibiotique . Les résultats figurent au tableau XVIII .

TABLEAU XVIII

ACTION DU LEUCOCYANIDOL SUR CANDIDA ALBICANS APRES EXTRACTION DU CUIVRE

Temps de contact avant l'ensemencement	Nombre de survivants dans un ml d'une dilution décimale effectuée 60 minutes après l'ensemencement
LC + Cu^{++} (1 mM + 0,1 mM) Une heure de contact	0
LC + Cu^{++} (id.) Deux heures de contact	48
LC + Cu^{++} (id.) Trois heures de contact	360
LC + Cu^{++} (id.) Une heure puis extraction de Cu^{++}	∞ *
LC + Cu^{++} (id.) Deux h. puis extraction	∞
LC + Cu^{++} (id.) Trois h. puis extraction	∞

Témoin : 67 000 levures par ml. * Colonies confluentes.

10°- Oxydation enzymatique .

Si le cuivre n'agit que comme catalyseur de la réaction d'oxydation, son action se rapproche de celle des polyphénoloxydases . Ces enzymes à base de cuivre se divisent en tyrosinases et laccases . Les premières oxydent aussi bien les mono que les diorthophénols . Elles sont sans action sur l'hydroquinone . Les secondes agissent aussi bien sur les para que sur les orthodiphénols . Selon les données les plus récentes obtenues par spectroscopie de résonance électro-paramagnétique, le cuivre serait le pivot de l'action oxydante (166) . Chez les premières, on le retrouve à l'état réduit . Il servirait de véhicule, de support, à un atome d'oxygène . Chez les laccases, il est bivalent . Il est réduit lors de la réaction enzymatique . Il ne cèderait qu'un électron, les premiers produits formés étant des radicaux libres ou semiquinones . Dans le cas des tyrosinases, il y a transfert de deux électrons, d'où formation de quinones (173) .

Ces formes instables (quinone et radical libre) sont cependant interconvertibles . Il s'établit un équilibre dépendant essentiellement des conditions du milieu ambiant (173) . Etant hautement réactives, elles réagissent rapidement entre elles : elles se polymérisent . Si cependant, elles se trouvent en présence d'autres composés, tels des acides aminés, des protéines, elles peuvent s'y additionner en les dénaturant, d'où leur activité bactéricide intense . Lors du broyage des feuilles de thé en milieu humide, la polyphénoloxydase, entrant en contact avec les polyphénols les oxyde . C'est la réaction, faussement dénommée, de fermentation. BENTON (234) observe durant la phase dite quinonique de cette oxydation une diminution considérable du nombre de bactéries viables dans le milieu réactionnel .

A la suite de cette observation, nous avons tenté de déterminer si une oxydation enzymatique du leucocyanidol entraînait une action candidicide aussi marquée que lors de la catalyse cuivrique .

Protocole :

a) Préparation enzymatique .

Nous utilisons une préparation brute d'artichaut (Cynara scolymus). L'enzyme est extrait selon une technique mise au point par MICHAUD (200) . Le légume est d'abord rapidement broyé en milieu acétonique refroidi à -20°C . La solution, contenant les polyphénols, est rejetée . La poudre est ensuite lavée à l'eau distillée glacée jusqu'à obtention d'une eau ne réagissant plus à la ninhydrine . La préparation ainsi obtenue est une poudre amorphe de couleur chamois . Mise en suspension elle oxyde le catéchol avec production, en présence d'acides aminés, de colorations caractéristiques (219-220) .

b) Essai antibiotique .

On pipette, dans chacun des quatre tubes à essai, dix ml d'une solution tamponnée à pH 6 par du phosphate acide de potassium (7 mM) et préalablement ensemencée avec une culture de 24 heures de Candida albicans. Un premier tube sert de témoin . Dans les trois autres , on dissout 34, 2 mg de leucocyanidol . On ajoute à l' un d'eux 0, 1 ml d'une solution contenant 10 mM de chlorure de cuivre par ml . Les deux autres reçoivent la préparation enzymatique : l'un 25 mg, l'autre 75 mg . Afin de permettre l'entrée d'air nécessaire à l'oxydation enzymatique les couvercles des tubes ne sont pas vissés . On abandonne deux heures à 37°C avec agitation toutes les quinze minutes .

Résultats :

Les résultats figurent au tableau XIX . Contrairement à notre attente, l'oxydation enzymatique du leucocyanidol n'amène aucune antibiose .

Commentaires :

L'oxydation enzymatique étant très rapide, il est fort possible que les formes quinoniques ne subsistent pas assez

longtemps (210) . Il se peut aussi que, la préparation utilisée n'étant pas pure, les quinones aient pu réagir, pour une bonne part, avec les protéines et les autres produits étrangers accompagnant l'enzyme .

TABLEAU XIX

OXYDATION ENZYMATIQUE : ESSAI ANTIBIOTIQUE

Concentrations	Survivants par ml après 2 heures
Témoin	19 000
LC 10 mM + enzyme, 25 mg	27 600
LC 10 mM + enzyme, 75 mg	28 000
LC 10 mM + Cu^{++} 0,1 mM	0

11°- Catalyse cuivrique:tentative d'explication .

a) Introduction :

A la suite de l'expérimentation chromatographique, le rôle catalyseur du cuivre ne fait plus aucun doute : pour des conditions expérimentales rigoureusement identiques le polyphénol se polymérise beaucoup plus rapidement en présence du métal .

Il se produit des formes intermédiaires hautement réactives : elles s'additionnent facilement à l'aniline et aux acides aminés et semblent responsables de la forte

activité levuricide, probablement en dénaturant les protéines de surface, dont les enzymes (221, 172) .

Mais comment expliquer cette catalyse ? Pour ce faire, nous revenons à notre hypothèse du début .

Selon DETTY, HESTON et WENDER (60) la plupart des flavonoïdes, dont ceux possédant une structure catéchol sur le noyau B , sont capables de chélater le cuivre . Une étude potentiométrique leur suggère la formation possible d'un complexe 1 : 2 entre le cuivre et l'épicathéchine, isomère de la catéchine, donc de structure flavannique, ressemblant à un hydroxyle près au leucocyanidol .

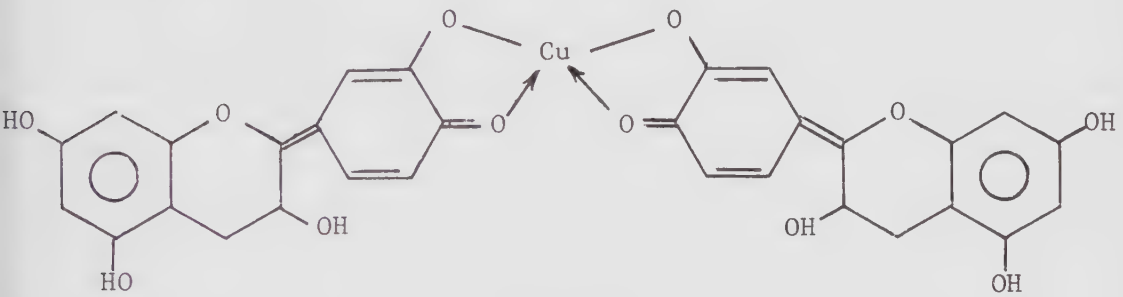


Fig. XXX

STRUCTURE POSSIBLE
DU CHELATE EPICATECHINE-CUIVRE

(voir SZECHENYI (270))

KELLEY et WATTS (137) puis LEWIS et WATTS (153) établissent une relation directe entre la possibilité pour les polyphénols de former des chélates stables et difficilement dissociables avec le cuivre et leurs propriétés inhibitrices sur l'activité pro-oxydante de l'acide ascorbique vis-à-vis des lipides . Ils expliquent ainsi les propriétés protectrices du quercétol sur le rancissement des graisses et proposent deux sites chélateurs.

La stabilité du chélate proviendrait d'une possibilité de résonance entre les deux structures de la figure XXXI .

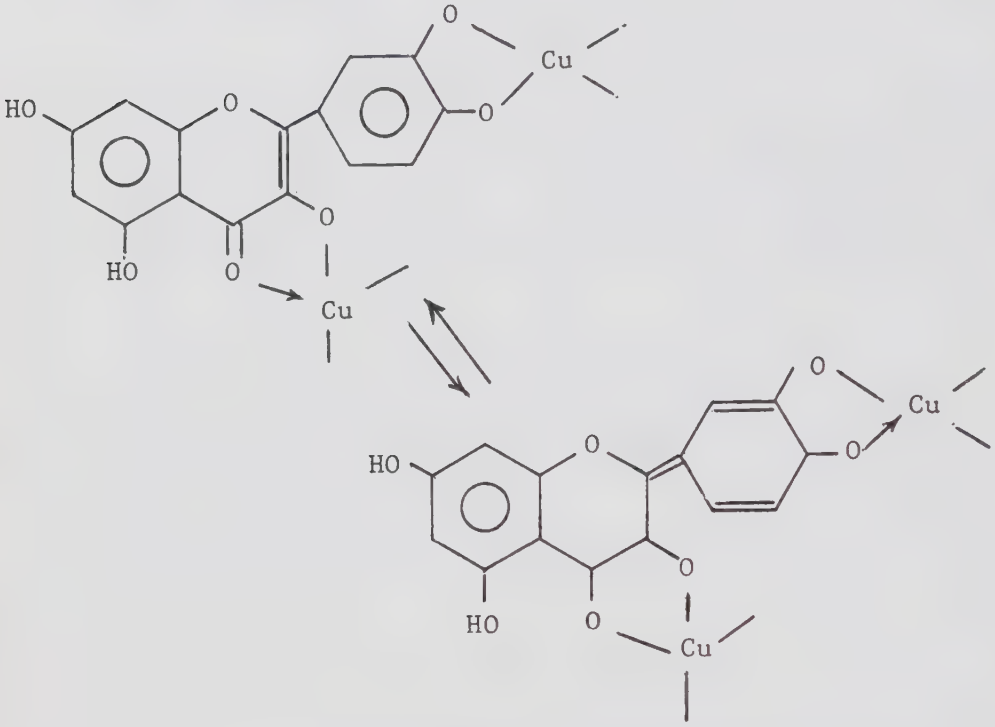


Fig. XXXI

RESONANCE DU COMPLEXE QUERCETOL-CUIVRE

Certains polyphénols, bien qu'ils possèdent des structures leur permettant de chélater le métal, forment des complexes solubles ne retenant pas adéquatement les ions cuivriques . Ainsi fonctionnent le catéchol, le gallate de propyle, la gallocathéchine (137) .

L'oxydation du leucocyanidol par le cuivre pourrait s'expliquer d'une façon analogue . Au lieu de partager un électron avec l'atome métallique, le noyau B du flavanne serait beaucoup plus porté à le lui céder . L'ion cuivreux étant peu apte à s'associer avec le noyau ainsi oxydé, le chélate se dissocierait avec production d'une part de l'ion cuivreux, et d'autre part, du radical libre du leucocyanidol (74) . Ce radical libre est une forme hautement réactive (282) comme le sont les quinones. Ces structures sont d'ailleurs interconvertibles suivant les conditions du milieu ; pH , concentration ionique . . . etc (166) . Il est à noter, qu'à la suite d'études du spectre de résonance électroparamagnétique, la formule du radical libre ne doit pas s'inscrire AH, mais bien $(AH_2)^+$ (166) . La réaction pourrait se schématiser comme l'indique la figure XXXII .

(voir figure page suivante)

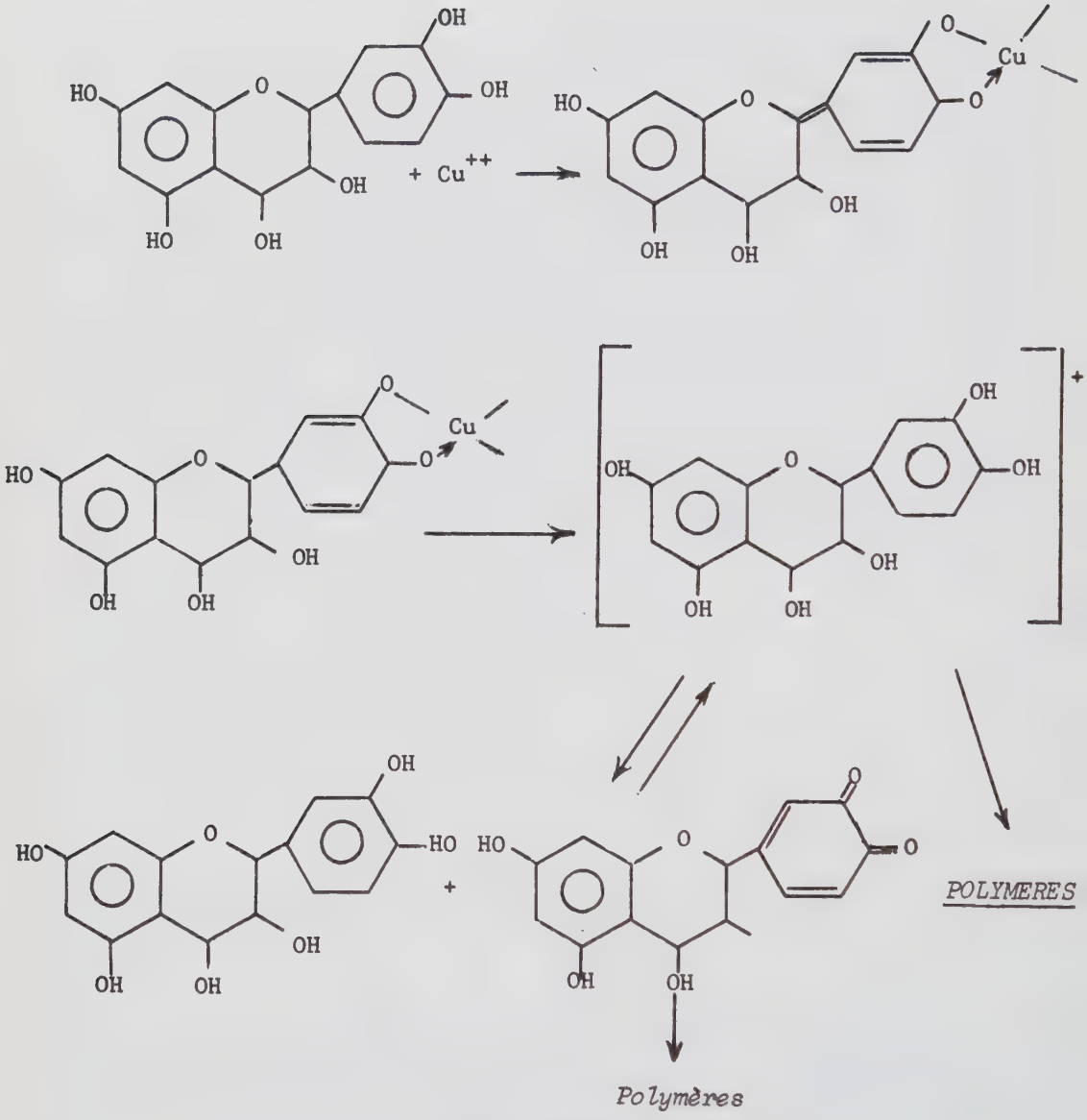


Fig. XXXII

OXYDATION DU LEUCOCYANIDOL PAR LES IONS CUIVRIQUES

Il s'agirait d'un mécanisme d'oxydation analogue à celui de l'acide ascorbique par les ions cuivriques tel que WEISSBERGER et LUVALLE l'ont proposé (291) .

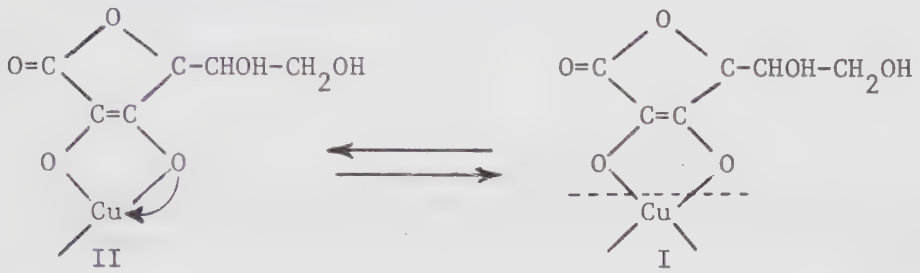


Fig. XXXIII

OXYDATION DE L'ACIDE ASCORBIQUE PAR LES IONS CUIVRIQUES. FORMATION D'UN CHELATE PUIS DISSOCIATION (67).

Le cuivre serait ensuite réoxydé selon l'équation suivante (74) :

$$2\ Cu^{+} + 2\ H^{+} + O_2 \longrightarrow 2\ Cu^{++} + H_2O_2$$

b) Dégagement d'ions hydrogène.

Protocole :

Nous dissolvons dans 49,5 ml d'eau distillée, 171mg de leucocyanidol en poudre . Le pH est déterminé avant puis après addition de 0,5 ml d'une solution M de chlorure de cuivre . On détermine, de même, le pH d'une solution cuivrique de même molarité et de même volume . Pendant tous ces essais, les diverses solutions sont soumises à une agitation magnétique constante .

Résultats :

Le pH de la solution 10 mM de leucocyanidol passe de 3, 8 à 3, 5 par addition de chlorure cuivrique pour une même concentration finale . Celui de la solution du cuivre est de 4, 55 . Il faut aussi noter que la solution du flavanne, rouge brunâtre, change instantanément au jaune par addition du métal .

Commentaires :

Le changement instantané de couleur indique une réaction immédiate entre les deux composés . Le dégagement en ions hydrogène pourrait bien être dû à un phénomène de chélation :

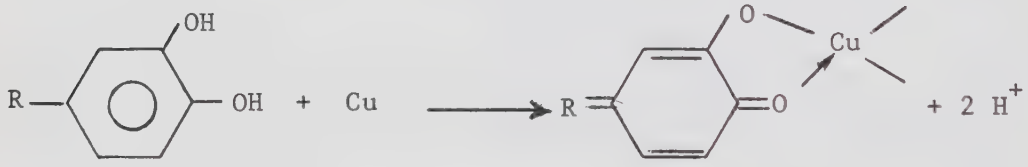


Fig. XXXIV

c) Etude spectrale

Nous reproduisons en figure XXXV les résultats obtenus par MASQUELIER (185) . L'auteur utilise un spectrophotomètre enregistreur Unicam S. P. 800 . Après détermination du spectre d'absorption d'une solution éthanolique (96 p 100) extemporanée de leucocyanidol (0, 2 mM), on ajoute de l'acétate de cuivre pour une concentration finale double de celle du polyphénol (0, 4 mM). Le passage des rayons U. V. n'est nullement affecté par le cuivre seul aux longueurs d'ondes utilisées .

La modification provoquée par les ions métalliques est instantanée, ce qui signifie une réaction immédiate entre les deux produits. La formation d'un chélate est tout à fait compatible avec un tel phénomène .

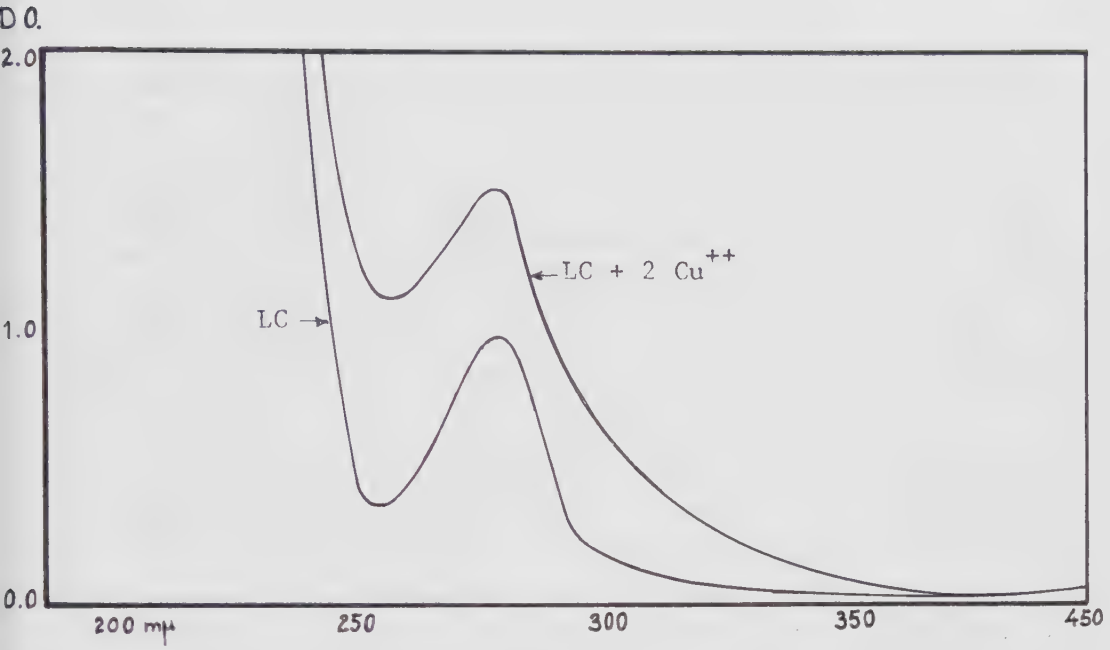


Fig. XXXV

SPECTRE D'ABSORPTION DU LEUCOCYANIDOL SEUL (LC) PUIS IMMEDIATEMENT APRES ADDITION D'IONS CUIVRIQUES (LC + 2 Cu^{++}) (185)

D/ CONCLUSIONS .

A la suite de ces différents essais, il semble bien que ce soit l'oxydation du flavanne en un radical libre ⇌ quinone qui soit responsable de la forte activité candidicide constatée "in vitro" . Ces formes oxydées instables réagissent vivement avec les protéines au niveau des groupements sulfhydryles (120) et amines (2) (221) , les dénaturant, empêchant ainsi toute activité enzymatique (96) ou interférant avec les phénomènes de perméabilité .

Que ces structures possèdent des propriétés antibiotiques marquées n'est pas un fait nouveau . Certains auteurs expliquent la résistance des plantes à l'infection par l'oxydation enzymatique des o-diphénols. Les formes intermédiaires pourraient être responsables d'une action directe sur les microorganismes envahisseurs (135, 243) . Cependant, selon plusieurs autres, l'oxydation enzymatique étant très rapide et les formes quinoniques n'ayant qu'une existence très éphémère (210), ce seraient les produits hautement polymérisés qui, formant bouclier, empêcheraient une diffusion subséquente du pathogène(254).

Disons , à l'appui de cette thèse, qu'il existe dans la littérature de nombreux exemples où l'oxydation enzymatique de polyphénols n'entraîne que peu ou pas d'activité inhibitrice sur divers enzymes ou microorganismes (164, 231) . Nous en arrivons au même résultat .

D'autre part, il est fort possible que la concentration en tampons et en ions hydrogène joue sur la nature et la durée des composés intermédiaires . C' est ce qui pourrait expliquer le peu de toxicité aux pH supérieurs à 7,5 ou en tampons 0,05 mM .

CHAPITRE V
APPLICATIONS PRATIQUES

°°°

A/ ACTIVITE "PER OS" .

1°- Sur la levure saprophyte de la souris .

Dans un examen préliminaire de la flore fécale des souris que nous devions soumettre à l'expérimentation, nous avons découvert, chez chacune d' elles, la présence d'une levure saprophyte qui pourrait bien être du même type que celle isolée d'une façon identique par STERNBERG et coll. (262) .

A la suite de cette observation, il nous est apparu intéressant de nous servir de ce microorganisme pour déterminer l'activité du mélange leucocyanidol + cuivre "in vivo", si toutefois les essais "in vitro" nous prouvent que cette levure est aussi sensible que Candida albicans au mélange étudié .

a) Essai "in vitro" .

Protocole :

Nous utilisons deux tubes . Le premier reçoit 9ml d'une solution aqueuse stérile tamponnée à pH 6 par du phosphate de potassium, 7 mM . On l'ensemence avec un

ml d'une dilution centésimale d'une culture de 24 heures de la levure à étudier en bouillon Sabouraud glucosé . Le second reçoit la même quantité de levure pour 7 ml de la solution tampon . Le volume est complété à dix ml par des solutions aqueuses de leucocyanidol et de chlorure de cuivre pour des concentrations finales de 1 mM et 0,1 mM respectivement .

Le témoin est immédiatement dénombré par mélanges en boîtes de Pétri d'un ml de dilutions décimales successives de ce tube avec 10 ml de milieu de Sabouraud gélosé . Cette même opération est répétée avec le second tube , mais après deux heures de contact .

Résultats :

Le témoin donne 54,000 levures viables par ml . Dans le second tube, où les levures sont soumises à l'action du mélange leucocyanidol + cuivre pendant deux heures, il ne subsiste aucune levure vivante .

Il ressort donc de cet essai que cette levure saprophyte, sensible "in vitro" à l'action du mélange étudié , peut fort bien nous servir de cible pour l'expérimentation "in vivo" .

b) Essai "in vivo" .

Protocole :

Seize souris dont les poids individuels varient entre 21 et 24 g sont réparties en deux cages . Chaque animal a été préalablement marqué à l'aide de colorants de façon à ce que l'on puisse suivre son évolution tout au long de l'expérience .

Le premier groupe sert de témoin . Les animaux du second groupe reçoivent quotidiennement, par voie orale, à l'aide d'une seringue équipée d'une aiguille à pointe mousse, 0,5 ml d'une solution tamponnée à pH 6 par du phosphate de potassium 7 mM et contenant 1,71 mg de leucocyanidol (10 mM) et 0,085 mg de chlorure de cuivre (1 mM) .

Un échantillon de selles pesant environ 0,1gm est recueilli aseptiquement tous les jours de chacune des souris mises pour la circonstance dans des cages individuelles fabriquées à cet effet . Chaque spécimen est exactement pesé puis mis en suspension par agitations vigoureuses dans dix ml d'eau distillée stérile .

Après dispersion complète, on y prélève, à l'aide d'un fil à boucle calibré, 0,01 ml, que l'on étale le plus uniformément possible sur une surface d'un cm^2 d'une lame bien propre . Après séchage et fixation, la préparation est colorée au Gram modifié par HUCKER (voir CONN et coll. (49)-) , puis examinée à l'immersion.

Le diamètre du champ étant de 0,16 mm, la surface observée sera de : $3,1416 \times 0,08^2$ c'est-à-dire 0,02 mm^2 . Comme la surface totale est de 100 mm^2 , chaque champ représente donc 1/5000 de cette surface , soit 1/5,000,000 de l'échantillon de selles puisque ce dernier a été suspendu dans dix ml . Afin de remédier à une dispersion qui ne peut être parfaite, on calcule la moyenne d'une trentaine d'observations bien réparties sur la surface de la lame à observer (voir à ce sujet COLLINS, C.H. (48) page 144) .

L'examen des selles commence deux jours avant, puis se poursuit pendant les cinq jours où l' on administre le mélange leucocyanidol + cuivre .

Résultats :

Nous n'avons observé de modifications ni dans l'équilibre bactérien de la flore, ni dans la concentration de la levure saprophyte . Cette concentration varie suivant les animaux entre 500 et 200 millions par gramme de selles .

2°- Sur l'infestation intestinale de la souris par Candida albicans .

L'expérience précédente avait pour but de déterminer l'action d'une dose relativement faible de leucocyanidol + cuivre sur le taux d'une levure déjà installée en quantité appréciable dans le tractus intestinal de la souris . Nous voulions savoir si le mélange pouvait avoir une action curative .

Pour compléter cet essai "in vivo" il nous est apparu intéressant de déterminer si le mélange pouvait avoir un rôle prophylactique sur la multiplication d'une levure présente en faible quantité . S'il pouvait empêcher une possible infestation, ceci justifierait son emploi en médecine humaine, au cours de traitements avec des produits susceptibles de favoriser une prolifération intestinale de Candida albicans , tels les antibiotiques et les corticostéroïdes .

La souris ne semble pas constituer un animal de choix dans l'infestation intestinale expérimentale à Candida albicans . STERNBERG et coll. (262) puis LINDH (155) se voient obligés d'employer des doses massives de levures (jusqu'à 60 millions) . Il ne nous semble pas interdit de penser que, dans un tel cas, il n'y ait pas vraiment implantation, mais simple passage de la levure dans le tractus digestif, une dose plus forte amenant une période d'élimination plus prolongée .

Partant du principe que les antibiotiques favorisent la prolifération "in vivo" de Candida albicans HUPPERT, CAZIN et SMITH (128) obtiennent, semble-t-il, un véritable "établissement" intestinal . Cette infestation n'est cependant pas régulière, une partie seulement des animaux inoculés donnant une réponse positive .

Dans les essais qui vont suivre, nous n'en avons pas moins utilisé des souris, mais en prenant pour acquis, à la suite des observations de RIMBAUD et coll. (232), que le régime alimentaire pouvait, en plus des antibiotiques, amener un terrain favorable à la prolifération intestinale de Candida albicans .

Protocole :

Nous utilisons les mêmes souris que précédemment, mais après deux semaines de repos . Un examen préliminaire des selles confirme l'absence de Candida albicans et l'uniformité de la flore bactérienne chez toute la population . Les poids varient entre 30 et 50 g .

a) Infestation et administration du mélange .

Les souris soumises à l'expérience sont réparties en trois cages . Chaque animal du premier groupe reçoit quotidiennement , par voie orale à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille à pointe mousse :

- 0, 5 ml d'une culture de 24 heures de Candida albicans en milieu de Sabouraud glucosé liquide .
- 0, 8 mg d'oxytétracycline en eau distillée stérile . Cette dose est administrée deux fois par jour, soit un total quotidien de 1, 6 mg .
- 8, 55 mg de leucocyanidol et 0, 085 mg de chlorure de cuivre dissous dans 0, 5 ml d'eau distillée tamponnée à pH 6 par du phosphate de potassium 7mM. Cette dose est administrée deux fois par jour pendant les deux premiers jours, puis trois fois par jour ensuite .

La levure et l'antibiotique sont administrés pendant sept jours . Le traitement antifongique est continué pendant deux autres jours, soit un total de neuf jours.

Les souris du second groupe ne reçoivent que la levure et l'antibiotique . L'autre groupe sert de témoin.

b) Recueil des selles :

Les selles sont recueillies comme précédemment . Cependant, une fois la dispersion effectuée en eau distillée stérile, on y prélève 0, 1 ml que l'on mélange en boîte de Pétri avec 10 ml de YNBM gélosé auquel on a

préalablement ajouté 0,25 mg d'oxytétracycline par ml. Le Yeast Nitrogen Base (Difco) est préféré au Sabouraud parce qu'il empêche le développement de la levure saprophyte étudiée précédemment .

c) Nutrition .

La nourriture solide est une préparation commerciale . Elle se présente sous forme d'une poudre desséchée et pressée en bâtonnets . L'eau du robinet constitue la partie liquide .

A la suite des observations de RIMBAUD et coll. (232) sur le chien, le rôle du régime alimentaire est apparu comme primordial dans l'établissement de l'infestation : en abandonnant une alimentation carnée au profit d'un régime à base de pâtes, les auteurs obtiennent d'excellents résultats .

Pour notre part, il nous est apparu préférable de conserver la nourriture solide supposée complète et bien équilibrée et de fournir les hydrates de carbone sous forme de solutions à boire . Afin d'évaluer l'effet produit par le changement diététique , nous avons commencé l'essai avec l'eau du robinet, et ce n'est qu'au soir du quatrième jour que nous lui avons ajouté 20 p 100 de glucose .

Résultats :

Il ressort des résultats inscrits au tableau XX que le mélange leucocyanidol + cuivre ne semble pas posséder une action candidicide "in vivo" . Il apparaît même une plus grande quantité de levures dans les selles des souris traitées .

D'autre part, il semble bien que l'addition de glucose favorise la prolifération intestinale de Candida albicans chez la souris . Cependant, ce simple apport ne suffit pas à maintenir le taux atteint, puisque deux jours après avoir cessé l'administration de la levure, on constate une chute brusque de la concentration fécale .

TABLEAU XX - NUMERATION DES SELLES DE SOURIS INFESTEES PAR CANDIDA ALBICANS ET TRAITEES PAR LE MELANGE LC + CUIVRE. (a, b).

	3ème jour	4ème jour	5ème jour	6ème jour	7ème jour	9ème jour
1)	2 222	>800 000	60 816	54 000	86 000	2 797
2)	58 461	145 100	252 381	621 929	468 000	57 500
3)	0 c	218 032	56 410	632 500	74 358	3 636
4)	>d 421 052	>800 000	>500 000	162 767	>500 000	>700 000
5)	0	356 666	450 000	463 000	151 532	29 060
6)	0	22 988	500 000	280 900	>700 000	28 333
7)	0	7 692	>800 000	352 272	15 383	5 555
8)	2 857	15 384	260 000	>820 000	45 240	13 700
9) e	0	6 666	65 217	1 241 448	>2 500 000	125 000
10)	1 802	1 333	0	100 000	15 151	1 900
11)	0	3 333	12 500	28 000	38 095	2 820
12)	0	7 692	>1 333 333	94 117	>1 000 000	15 873
13)	0	5 840	32 353	90 410	> 800 000	2 300
14)	0	0	4 255	10 000	16 000	18 460
15)	0	2 041	244 186	22 856	1 316	1 430
16)	4 694	0	>1 430 000	>1 250 000	-	16 471

a) Nombre de levures par gramme de selles.

b) Les selles des animaux témoins ne donnent naissance à aucune colonie pendant toute la durée de l'essai.

c) Aucune colonie. Nombre de levures inférieur à 2 000 - 4 000 par gramme.

d) Colonies confluentes. Nombre limite calculé d'après le poids et la dilution des selles.

e) Les animaux numérotés de 1 à 8 constituent le premier groupe. Ceux numérotés de 9 à 16 forment le second groupe.

B/ ACTIVITE LOCALE.

Nous avons suivi, avec quelques modifications toutefois, la technique mise au point par LUDEWIG (162).

Protocole :

Nous utilisons douze souris, dont six servent de témoins . Les animaux sont d'abord rasés sur une partie du dos . Après anesthésie à l'éther on pratique sur la partie rasée une scarification cruciforme profonde, jusqu'au plan musculaire . A cet effet, on utilise la pointe d' une lame de rasoir stérile maintenue obliquement par rapport au plan cutané de l'animal . On laisse sécher pendant une heure puis on enfouit, sous le caillot formé, une goutte d'une culture de 4 jours de Candida albicans sur milieu de Sabouraud liquide . Pour cette dernière opération, on s'aide d'une pipette Pasteur bien effilée .

Le traitement antifongique commence vingt heures après l'inoculation . On injecte directement dans la plaie 0, 1 ml d'une solution 50 mM de leucocyanidol (1, 71 mg) et 5 mM de chlorure de cuivre (0, 085 mg). Cette solution est tamponnée à pH 6 par du phosphate de potassium (1 gm/litre) . Ces injections sont poursuivies pendant quatre jours, matin et soir . Pendant ce temps, les animaux témoins reçoivent la même quantité de la solution tamponnée dépourvue de ses constituants antimicrobiens .

Dix-huit heures après la huitième injection, la croûte recouvrant la plaie est soulevée aseptiquement de façon à ce qu'on puisse y enfoncer un écouvillon stérile . Après bris aseptique de ce dernier au niveau de la tige, la partie tampon est incubée quatre jours dans du bouillon Sabouraud maintenu à 37°C .

Pour l'isolement, on coule en boîtes de Pétri du Yeast Nitrogen Base Difco gélosé, maltosé à 2 p 100 et contenant 0,25 mg d'oxytétracycline par ml . On laisse sécher puis l'on étend en surface une goutte de la culture en bouillon Sabouraud . On incube à nouveau à 37°C .

Résultats et conclusion :

Les boîtes de Pétri correspondant aux souris traitées demeurent vierges . Par contre, chez les témoins, les colonies sont souvent confluentes . On les identifie par les techniques décrites au troisième chapitre à savoir: filamentation en sérum, auxanogramme, zymogramme et formation de chlamydospores sur milieux appropriés .Ce sont bel et bien des Candida albicans .

Il nous est donc permis de conclure à la suite de cette observation que le mélange tamponné de leucocyanidol + cuivre possède une action levuricide locale importante susceptible de stériliser une plaie infectée par Candida albicans .

CONCLUSIONS GENERALES

Le mélange leucocyanidol + cuivre, en concentrations et conditions appropriées, se montre très toxique pour la levure Candida albicans . Il ne semble pas que cela soit dû à un phénomène de chélation ou que le cuivre demeure à l'origine de l'activité levuricide . Le métal aurait plutôt un rôle catalytique dans la réaction de polymérisation par oxydation de la molécule organique . L'action serait due à une ou aux formes intermédiaires qu'il est possible d'apparenter, d'après leurs réactions avec l'aniline et la glycine, aux quinones et aux radicaux libres . Les structures phénoliques plus ou moins polymérisées ne feraient preuve d'aucune toxicité .

Cette catalyse résulterait d'une chélation , puis d'une dissociation en ion cuivreux et radical libre du leucocyanidol . Ce dernier , interconvertible avec la structure quinonique, se transformerait peu à peu en un polymère dépourvu de toute propriété antibiotique .

Le mélange n'exerce, "per os", aucune influence sur le taux fécal de la levure saprophyte de la souris, ni n'empêche une implantation intestinale par Candida albicans . Les essais topiques externes se sont révélés beaucoup plus intéressants : nous avons réussi à stériliser des plaies infestées par Candida albicans .

Même si les leucoanthocyannes figurent parmi les composés les plus répandus du règne végétal , nous ignorons encore beaucoup de leurs propriétés .

Peut-être pourrait-on penser, à la suite de nos essais , que ces composés jouent un rôle important dans les mécanismes de résistance des plantes à l'infection .

Enfin, la présence de leucocyanidol dans bon nombre de nos aliments d'origine végétale, en particulier dans le vin, laisse présumer l'apparition d'une résistance à l'infestation par les levures, lorsque des traces de cuivre provoquent la formation de la structure quinonique .

B I B L I O G R A P H I E

1. AINSWORTH, G.C.
Pathogenic yeasts.
in : The chemistry and biology of yeasts.
Cook, A.H., édit., London, Academic Press, 1958, 587.

2. ALBERGHINA, F.A.M.
On enzyme inhibition by oxidixed chlorogenic acid.
Life Sciences, 1964, 3, 49-54.

3. ALTERAS, I., GRIGORIU, D., LAZAR, M., POROJAN, I., et GRAVILESCU, M.
Accidents à Candida des traitements par le Flagyl.
Dermatologica, 1965, 131, 309-314.

4. ANSEL, M. et THIBAUT, M.
Les sulfamidés et la multiplication des levures parasites de l'homme.
Thérapie, 1967, 22, 919-925.

5. ANTOINE, A.
Effet des ions cuivriques sur la levure. I. Action des ions Cu^{++} sur l'utilisation du glucose, des réserves et de l'acétate.
Biochim. Biophys. Acta, 1963, 74, 351-358.

6. ANTOINE, A.
La résistance de la levure aux ions cuivriques. Saccharomyces ellipsoideus.
Exper. Cell. Res., 1964, 36, 73-85.

7. ANTOINE A.
La résistance de la levure aux ions cuivriques.II.Saccharomyces cerevisiae, yeast foam, influence des ions Cu^{++} sur l'apparition de cellules résistantes.
Exper. Cel. Res., 1965, 37, 278-291.

8. ANTOINE,A.
La résistance de la levure aux ions cuivriques. III. Saccharomyces cerevisiae, yeast foam, nature de deux formes résistantes.
Exper. Cell Res., 1965, 40, 570-584.

9. ASHIDA, J.
Adaptation of fungi to metal toxicants.
Annu. Rev. Phytophatol., 1965, 3, 153-174.

10. BARTON, G.M., EVANS, R.S., et GARDNER, J.A.F.
Paper chromatography of phenolic substances.
Nature, 1952, 170, 249-250.

11. BARUAH, J.N., RAO, P.R., JANARDHANAN, K.K., GANGULY, D.
Fungitoxicity of different polyphenolic fractions of Acacia arabica bark.
Jour. Proc. Inst. Chem., 1963, 35, 303-306.

12. BATE-SMITH, E.C.
The contribution of phenolic substances to quality in plant products.
Qualitas Plantarum et Materiae Vegetabiles, 1958, 3/4, 440-455.

13. BATE-SMITH, E.C.
Plant phenolics in foods.
in : The pharmacology of plants phenolics.
Fairbairn, J.W., édit., London, Academic Press, 1959, 133-147.

14. BATE-SMITH, E.C.
The simple polyphenolic constituents of plants.
in : Wood Extractives, Hillis, W.E., édit., New-York, Academic Press, 1962, 133-158.

15. BAZEX, A.
Monoliases complicant les thérapeutiques antibiotiques, leur traitement par la vitamine B 12.
Presse méd., 1951, 59, 1528.

16. BEDFORD, P.D.
Black tongue and oral penicillin.
Brit. Med. J., 1946, 2, 63.

17. BEEVERS, H. et JAMES, W.O.
The behaviour of secondary and tertiary amines in the presence of cetechol and belladonna catechol oxidase.
Biochem. J., 1948, 43, 636-639.

18. BEHRMAN, H.T.
Pruritus vulvae due to Aureomycin.
J.A.M.A., 1950, 144, 995.

19. BELL, T.A., AURAND, L.W. et ETCHELLS, F.L.
Cellulase inhibitor in grapes leaves.
Bot. Gaz., 1960, 122, 143-148.

20. BELL, T.A. et ETCHELLS, J.L.
Pectinase inhibitor in grape leaves.
Bot. Gaz., 1958, 199, 192-196.

21. BELL, T.A., ETCHELLS, J.L., WILLIAMS, C.F. et PORTER, W.L.
Inhibition of pectinase and cellulase by certain plants.
Bot. Gas., 1962, 123, 220-223.

22. BENNS, B.G., GINGRAS, B.A. et BAYLEY, C.H.
Antifungal activity of some thiosemicarbazones and their copper complexes.
Appl. Microbiol., 1960, 8, 353-356.

23. BENOIT, R.E.
The effect of purified wattle tannin on the decomposition of some organic compounds and on enzyme activity.
Dissert. Abstracts, 1966, 26, 6302-6303.

24. BEUSTES, J.
Le traitement de la moniliase intestinale du cobaye provoquée par les antibiotiques.
Thèse doct. Pharmacie (Univer.), Bordeaux, 1957.

25. BHAGVAT, K. et RICHTER,D.
Animal phenolases and adrenaline.
Biochem. J., 1938, 32, 1397-1406.

26. BHATIA, I.S. et ULLAH, R.
Oxidation of l-epicatechin gallate during the processing of Assam tea leaf.
Chem. Ind., 1961, 1169.

27. BLAMOUTIER, J., BATTISTELLI, F. et DENIMAL, C.
L'allergie à Candida albicans.
in : Entretiens Bichat, Paris, Expansion scientifique française, 1965, 121-124.

28. BORDOLI, D.N., BARUAH, J.N., GANGULY, D. et RAO, P.R.
Effects of polyphenolic extracts of Cassia fistula and Acacia catechu on the spore germination of Colletotrichum falcatum Went.
Curr. Sci., India, 1964, 33, 408.

29. BOUCHILLOUX, S.
Enzymatic browning reactions.
in : Plant phenolics and their industrial significance. Proc. Symp. of the Plant Phenolic Group of N.America (Oregon), Runeckles, V.C., édit., 1962, 1-13.

30. BOYD, J.F. et CHAPPELL, A.G.
Fatal mycetosis due to Candida albicans after conbined steroid and antibiotic therapy.
Lancet, 2, 19-22.

31. BROD, Dr.
Quelques cas d'allergie parasitaire.
Soc. Méd. Pau et Béarn, 1968, 68, 41.

32. BROWN, B.R.
Biochemical aspects of oxidative coupling of phenols.
Org. Substances Nat. Origin, U.S.A., 1967, 1, 167-201.

33. BROWN, B.R. et BOCKS, S.M.
Some new enzymic reactions of phenols.
in : Enzyme chemistry of phenolic compounds.
Pridham, J.B., édit., Oxford, Pergamon Press, 1963, 129-138.

34. BROWNE, S.G.
Moniliasis following antibiotic therapy.
Lancet, 1954, 1, 393.

35. BUCHALTER, L. et COLE, J.R.
Isolation of a potential antitumor fraction from Rumex hymenosepalus (Polygonaceae). II. Identification of the active fraction.
J. Phar. Sci., 1967, 56, 1033-1034.

36. BUREAU, Y., BARRIERE, H., LITOUX, P. et BUREAU, B.
Moniliase bucco-pharyngée particulièrement rebelle.

Atteinte rénale secondaire au traitement par l'amphotéricine B.
Bull. Soc. Franç. Dermatol. Syphiligr., 1965, 72, 414.

37. BUTTIAUX, R., BEERENS, H. et TACQUET, A.
Manuel de techniques bactériologiques.
Flammarion, Paris, 1966, 572 p.

38. BYRDE, R.J.W., FIELDING, A.H. et WILLIAMS, A.H.
The role of oxidized polyphynols in the varietal resistance of apples to brown rot.
in : Phenolics in plants in health and disease.
Pridham, J.B., édit., Oxford, Pergamon Press, 1960, 95-99.

39. CADMAN, C.H.
Inhibition of plant virus infection by tannins.
in : Phenolics in plants in health and didease.
Pridham, J.B., édit., Oxford, Pergamon Press, 1960, 101-105.

40. CAMPBELL, P.J. et HESELTINE, W.W.
An apparent growth stimulant for Candida albicans released from tetracycline-treated bacterial flora.
J. Hyg., 58, 95-97.

41. CHAPON, L., CHOLLOT, B. et URION, E.
Etude physico-chimique des associations entre protéines végétales et substances polyphénoliques.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1961, 43, 429-442.

42. CLARK, R.S., KUC, J., HENZE, R.E. et QUACKENBUCH,F.W.
The nature and fungitoxicity of an amino acid addition product of chlorogenic acid.
Phytopathology, 1954, 49, 594-597.

43. CLARK-LEWIS, J.W.
Leucoanthocyanins and leucoanthocyanidins.
in : The chemistry of flavonoid compounds.
Geissman, T.A., édit., Oxford, Pergamon Press, 1962, 217-247.

44. CLAVEAU, P.
Recherches biochimiques et pharmacologiques sur le leucocyanidol de la pruche.
Thèse doct. Pharmacie (Univer.),Bordeaux, 1964.

45. COHEN, B.
The measurement of pH, titrable acidity and oxydo-reduction potentials.
in : Manual of microbiological methods, Society of American Bacteriologists, New-York, McGraw-Hill, 1957, 72-98.

46. COLE, J.R. et BUCHALTER, L.
Isolation of a potential antitumor fraction from Rumex hymenosepalus.
J. Pharm. Sci., 1965, 54, 1376-1378.

47. COLE, M.
Oxidation products of leuco-anthocyanins an inhibitors of fungal polygalacturonase in rotting apple fruit.
Nature, 1958, 181, 1596-1597.

48. COLLINS, C.H.
Microbiological Methods.
Butterworths, London, 1967, 404 p.

49. CONN, H.J., BARTHOLOMEW, J.W. et JENNISON, M.W.
Staining methods.
in : Manual of microbiological methods, Society of American Bacteriologists, New-York, McGraw-Hill,1957, 10-36.

50. COUNTER, F.T., DUVALL, R.N., FOYE, W.O. et VANDERWYK, R.W.
The preparation and antibacterial action of metal chelates of some antitubercular agents, amino acids and peptides.
J. Pharm. Sci., 1960, 49, 140-143.

51. CREASY, L.L. et SWAIN, T.
Structure of condensed tannins.
Nature, 1965, 208, 151-153.

52. CROSS, W.C.
Oral reactions to penicillin.
Brit. Med. J., 1949, 1, 171.

53. CRUICKSHANK, I.A.M. et PERRIN, D.R.
Pathological function of phenolic compounds in plants.
in : Biochemistry of phenolic compounds.
Harbone,J.B.,édit.,London,Academic Press,1964,511-544.

54. DAS, D.N.
Studies on the antibiotic activity of tea.
J. Indian Chem. Soc., 1962, 39, 849-854.

55. DEBRE, R., MOZZICONACCI, P., DROUHET, E., DROUHET,V. et HOPPELER, A.
Les infections à Candida chez les nourrissons.
Ann. Peadiat., 1955, 184, 129-164.

56. De MELLO, G.C. et KISER, J.S.
The effect of several compounds on experimental infections with Candida albicans.
Antibiot. Ann., 1954-55, 678-685.

57. De MOSS, R.D. et BARD, R.C.
Physiological and biochemical technics.
in : Manual of microbiological methods.
American Society of Bacteriologists, New-York, McGraw-Hill, 1957, 167-198.

58. DESPEIGNES, J. et BATTESTI, M.R.
Méthode rapide pour l'étude de la fermentation des sucres par les levures.
Bull. Soc. Linn. Lyon, 1966, 35, 10-12.

59. DESVIGNES, A.
Les candidoses. II.
Le pharmacien biologiste, 1965, 4, 261-264.

60. DETTY, W.E., HESTON, B.O. et WENDER, S.H.
Amperometric titrations of some flavonoid compounds with cupric sulfate.
J. Amer. Chem. Soc., 1955, 77, 162-165.

61. DEVERALL, B.J.
Phenolase and pectic enzyme activity in the chocolate spot disease of beans.
Nature, 1961, 189, 311.

62. DEVERALL, B.J. et WOOD, R.K.S.
Chocolate spot of beans (Vicia faba L.) - interaction between phenolase of host and pectic enzymes of the pathogen.
Ann. Appl. Biol., 1961, 49, 473-487.

63. DOURMICHIDZE, S.V.
Questions de biochimie appliquées au traitement du raisin.

in : Fermentations et vinifications.
Institut national de la recherche agronomique,Paris, 1968, I, 55-70.

64. DROUHET, E.
Action de la nystatine (fungicidine) "in vitro" et "in vivo" sur Candida albicans et autres champignons levuriformes.
Ann. Inst. Pasteur, Paris, 1955, 88, 293-300.

65. DROUHET, E.
Some biological activities of antifungal antibiotics and their mode of action.
in : Systemic mycoses.
Ciba Found. Symp., (London) J.A. Churchill, 1968, 206-241.

66. DROUHET, E. et VIEU, M.
Facteurs vitaminiques de croissance des Candida.
Ann. Inst. Pasteur, Paris, 1957, 92, 825-831.

67. DWYER, F.P.
Enzyme-metal ion activation and catalytic phenomena with metal complexes.
in : Chelating agents and metal chelates.
Dwyer, F.P. et Mellor, D.P. édit., New-York Academic Press, 1964, 335-382.

68. EDDY, A.A.
Flocculation characteristics of yeasts. I. Comparative survey of various strains of Saccharomyces cerevisiae.
J. Inst. Brewing, 1955, 61, 307-312.

69. EDDY, A.A.
Flocculation characterictics of yeasts. II. Sugars as dispersing agents.
J. Inst. Brewing, 1955, 61, 313-317.

70. EDELBERG, R.
The action of tannic acid on model systems formed of constituents of the erythrocyte membrane.
J. Cell. Comp. Physiol., 1953, 41, 37-50.

71. EVELYN, S.R., MAIHS, E.A. et ROUX, D.G.
Condensed tannins. 5. The oxidative condensation of (+) catechin.
Biochem. J., 1960, 76, 23-27.

72. FARKAS, G.L. et KIRALY, Z.
Role of phenolic compounds in the physiology of plant diseases and disease resistance.
Phytopath. Z., 1962, 44, 105-150.

73. FIRENZUOLI, A.M., VANNI, P. et MASTRONUZZI, E.
The effect of some aromatic compounds on the pure enzymes and their subsequent reactivation by PVP and Tween 80.
Phytochemistry, 1969, 8, 61-64.

74. FLITMAN, R. et FRIEDEN, E.
Cuprous ion formation in cupric ion catalysed oxidations.
J. Amer. Chem. Soc., 1957, 79, 5198-5203.

75. FORSYTH, W.G.C.
Cacao polyphenolic substances. I. Fractionation of the fresh bean.
Biochem. J., 1952, 51, 511-516.

76. FORSYTH, W.G.C.
Cacao polyphenolic substances. 2. Changes during fermentation.
Biochem. J., 1952, 51, 516-520.

77. FOSTER, M.
Non-enzymatic oxidation of tyrosine and DOPA.
Proc. Natl Acad. Sci. (U.S.A.), 1950, 36, 606-611.

78. FREDRICK, J.F.
Chemical structure and fungitoxicity. I. Lipid solubility, chelation potential and electric charge as factors in the fungitoxic process.
Phyton, 1961, 17, 55-61.

79. FREUDENBERG, K.
Catechine und hydroxy-flavandiole als gerbstoffbildner.
Experientia, 1960, 16, 101-105.

80. FREUDENBERG, K. et WEINGES, K.
Catechins and flavonoid tannins.
in : The chemistry of flavonoid compounds.
Geissman, T.A., édit., Oxford, Pergamon Press, 1962, 197-216.

81. GABOR, M. et EPERJESSY, E.
Antibacterial effect of fisetin and fisetinidin.
Nature, 1966, 212, 1273.

82. GADAL, P. et BOUDET, A.
Sur l'inhibition des enzymes par les tannins des feuilles de Quercus Sessilis Ehrh. Inhibition de la -amylase.
C.R. Acad. Sc., Paris, 1965, 260, 4252-4255.

83. GALE, D. et SANDOVAL, B.
Response of mice to the inoculation of both Candida albicans and Escherichia coli. I. The enhancement phenomenom.
J. Bact., 1957, 73, 616-624.

84. GANGULY, A.K. et SESHADRI, T.R.
A study of leucoanthocyanidins of plants. II. (+) leucocyanidin from the gum of Butea frondosa.
Tetrahedron, 1959, 6, 21-23.

85. GAUDEFROY, M. et VIART, P.
Influence des antibiotiques sur la recrudescence actuelle des vaginites mycosiques.
Ann. Biol. Clin., 1955, 13, 133.

86. GINGRAS, B.A., COLIN, G. et BAYLEY, C.H.
Antifungal activity of thiosemicarbazones.
J. Pharm. Sci., 1965, 54, 1674-1675.

87. GIORGIO, A.J., CARTWRIGHT, G.E. et WINTROBE, M.M.
Preparation of a copper-deficient medium for yeast growth.
J. Bact., 1963, 86, 1037-1040.

88. GOLDSTEIN, J.L. et SWAIN, T.
Changes in tannins in ripening fruits.
Phytochemistry, 1963, 2, 371-383.

89. GOLDSTEIN, J.L. et SWAIN, T.
The inhibition of enzymes by tannins.
Phytochemistry, 1965, 4, 185-192.

90. GORCZYCA, L.R. et McCARTY, R.T.
Effects of prolonged low dosage antibiotic administration and surimposed Candida albicans infection on goat serum proteins.
Antibiot. Chemo., 1959, 9, 587-595.

91. GORDEE, R.S. et SIMPSON, P.J.
Relationships of X irradiation to the enhancement of Candida albicans infections.
J. Bact., 1967, 94, 6.

92. GRACIANSKY, P.(de), et DELAPORTE, J.
Accidents à levures des traitements par les antibiotiques.
Masson et Cie, Paris, 1956.

93. GRENIER, D.
Leucocyanidol et croissance végétale.
Thèse doct. Pharmacie (Etat), Bordeaux.

94. GUILLOT, N.
Elaboration par Lactobacillus acidophilus d'un produit actif contre Candida albicans.
Ann. Inst. Pasteur, Paris, 1958, 95, 194-207.

95. HAMILTON, G.A., HANIFIN, J.W. et FRIEDMAN, J.P.
The hydroxylation of aromatic compounds by hydrogen peroxide in the presence of catalytic amounts of ferric ion and catechol. Product studies, mechanism, and relation to some enzymic reaction.
J. Amer. Chem. Soc., 1966, 88, 5269-5272.

96. HAMMES, G.G.
Mechanism of enzyme catalysis.
Nature, 1964, 204, 342-343.

97. HANSECLEVER, H.F. et MITCHELL, W.O.
Acquired immunity to candidiasis in mice.
J. Bact., 1963, 86, 401-406.

98. HARRIS, C.M. et LIVINGSTONE, S.E.
Bidentate chelates.
in : Chelating agents and metal chelates.
Dwyer, F.P. et Mellor, D.P. édit., New-York, Academic Press, 1964, 95.

99. HARRIS, H.J.
Aureomycin and chloramphenicol in brucellosis.
J.A.M.A., 1950, 142, 161-165.

100. HARRISON, B.D. et PIERPOINT, W.S.
The relation of polyphenoloxidase in leaf extracts to the instability of cucumber mosaic and other plant viruses.
J. Gen. Microbiol.,1963,32, 417-427.

101. HASLAM, E.
Chemistry of vegetable tannins.
Academic Presse, London, 1966.

102. HATHWAY, D.E.
Oak-bark tannins.
Biochem. J., 1958, 70, 34-42.

103. HATHWAY, D.E.
Autoxidation of polyphenols. Part IV. Oxidative degradation of the catechin-autoxidation polymer.
J. Chem. Soc., 1958, 520-521.

104. HATHWAY, D.E.
The condensed tannins.
in : Wood extractives.
Hillis, W.E. édit. London, Academic Press, 1962, 191-228.

105. HATHWAY, D.E. et SEAKINS, J.W.T.
Autoxidation of catechin.
Nature, 1955, 176, 218.

106. HATHWAY, D.E. et SEAKINS, J.W.T.
Autoxidation of polyphenols. Part III. Autoxidation in neutral aqueous solution of flavans related to catechin.
J. Chem. Soc. 1957, 1562-1566.

107. HATHWAY, D.E. et SEAKINS, J.W.T.
Enzymic oxidation of catechin to a polymer structurally related to some phlobatannins.
Biochem. J., 1957, 67, 239-245.

108. HAYAISHI, O.
Oxygenases.
Academic Press, New-York, 1962.

109. HENRY, B. et FAHLBERG, W.J.
The potentiating effect of hydrocortisone acetate and tetracycline on monilial infection in mice.
Antibiot. Chemo., 1960, 10, 114-120.

110. HENZE, R.E.
The inhibition of enzymatic browning of chlorogenic acid solutions with cysteine and glutathione.
Science, 1956, 123, 1174-1175.

111. HERZ, F.
On the effects of tannic acid on erythrocyte membrane acetylcholinesterase.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 1968, 127, 1240-1245.

112. HERZ, F. et KAPLAN, E.
Effects of tannic acid on erythrocyte enzymes.
Nature, 1968, 217, 1258-1259.

113. HILL, D.W. et GEBHARDT, L.P.
Morphological transformation of Candida albicans in tissues of mice.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1956, 92, 640-644.

114. HILLIS, W.E.
Leuco-anthocyanins as the possible precursors of tannins.
in : The chemistry of vegetable tannins.
Symp. Soc. Leather Tr. Chem., Croydon, 1956, 121-126.

115. HILLIS, W.E.
Formation of Condensed Tannins in Plants.
Nature, 1958, 182, 1371.

116. HILLIS, W.E. et URBACH, G.
Leuco-anthocyanins as the possible precursors of tannins.
Nautre, 1958, 182, 657-658.

117. HOLDEN, M.
An investigation on polyphenolic compounds of the cacao leaf in connexion with a chemical method for detecting virus infection.
J. Sci. Food Agric., 1957, 8, 553-561.

118. HOROWITZ, R.M.
Detection of Flavanones by Reduction with Sodium Borohydride.
J. Org. Chem., 1957, 22, 1733-1735.

119. HSIA, C., CLAYPOOL, L.L., ABERNETHY, J.L. et ESAU,P.
Leucoanthocyan material from immature peaches.
J. Food Sci., 1964, 29, 723-729.

120. HULME, A.C.
Some aspects of the biochemistry of apple and pear fruits.
Adv. Food Res., 1958, 8, 297-413.

121. HULME, A.C. et EDNEY, K.L.
Phenolic substances in the peel of Gox's Orange Pippin apples with reference to infection by G. perennans.
in : Phenolics in plants in health and disease.
Pridham, J.B., édit., Oxford, Pergamon Press, 1960, 87-94.

122. HULME, A.C. et JONES, J.D.
Tannin inhibition of plant mitochondria.
in : Enzyme chemistry of phenolic compounds.
Pridham, J.B., édit., Oxford, Pergamon Press, 1963, 97-120.

123. HULME, A.C., JONES, J.D. et WOOLTORTON, L.S.C.
Mitochondrial preparations from flowers.
Nature, 1964, 201, 795-797.

124. HUMPHRIES, S.G.
The biosynthesis of tannins.
in : Biogenesis of natural compounds.
Bernfield, P., édit., Oxford, Pergamon Press, 1967, 801-827.

125. HUNTER, F.R.
The effect of tannic acid on the permeability of erythrocytes to non-electrolytes.
J. Cell. Comp. Physiol., 1960, 55, 175-188.

126. HUPPERT, M., MacPHERSON, D.A. et CAZIN, J.
Pathogenesis of Candida albicans infection following antibiotic therapy. I. The effect of antibiotics on the growth of Candida albicans.
J. Bacteriol., 1953, 65, 171-176.

127. HUPPERT, M. et CAZIN, J.Jr.
Pathogenesis of Candida albicans infection following antibiotic therapy. II. Further studies of the effect of antibiotics on the "in vitro" growth of Candida albicans.
J. Bacteriol.,1955, 70, 435-439.

128. HUPERT, M., CAZIN, J.Jr. et SMITH, H.
Pathogenesis of Candida albicans infection following antibiotic therapy. III. The effect of antibiotics on the incidence of Candida albicans in the intestinal tract of mice.
J. Bacteriol., 1955, 70, 440-447.

147. KUC, J.
Phenolic compounds and disease resistance in plants.
in : Plant phenolics and their industrial significance.
Proc. Symp. Plant Phenolic Group N. Am.(Oregon), Runeckles, V.C., édit., 1963.

148. KUC, J.
Resistance of plants to infectious agents.
Annu. Rev. Microbiol., 1966, 20, 337-370.

149. LALITHAKUMARI, H., SIRSI, M. et GOVINDARAJAN, V.S.
Antibacterial and antifungal activities of Areca catechu Linn.
Indian J. Exp. Biol., 1965, 3, 66-67.

150. LAMB, J. et SREERANGACHAR, H.B.
"Fermentation" of Ceylon tea.
Biochem. J., 1940, 34, 1472.

151. LAMBIN, S. et GERMAN, A.
Précis de microbiologie.
Masson et Cie, Paris, 1969, tome 1, 669 p.

152. LEVY, E.S. et COHEN, D.B.
Systemic moniliasis and aspergillosis complicating corticotrophin therapy.
Arch. Int. Med., 1955, 95, 118-122.

153. LEWIS, E.J. et WATTS, B.M.
Antioxidant and copper binding properties of onions.
Foof Research, 1958, 23, 274-279.

154. LIEBESKIND, A.
Candida albicans as allergic factor.
Ann. Allergy, 1962, 20, 394-396.

155. LINDH, H.F.
A method for evaluation of antifungal drugs against enteric Candida albicans in mice.
Antibiot. Chemo., 1959, 9, 226-231.

156. LIPNIK, M.J., KLIGMAN, A.M. et STRAUSS, R.
Antibiotic and fungous infections.
J. Invest. Derm., 1952, 18, 247-260.

157. LODDER, L. et KREGER-VAN RIJ, N.J.W.
The yeasts. A taxonomic study.
North Holland Pub.Co., Amsterdam, 1952.

158. LODDER, J., SLOOFF, W.CH., KREGER-VAN RIJ, N.J.W.
The classification of yeasts.
in : The chemistry and biology of yeasts.
Cook, A.H., édit., London, Academic Press, 1958,1-62.

159. LOH, W.P. et BAKER, E.E.
Fecal flora of man after oral administration of chlortetracycline or oxytetracycline.
Arch. Int. Med., 1955, 95, 74-82.

160. LOURIA, D.B. et BRAYTON, R.G.
Behaviour of Candida cells within leucocytes.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 1964, 115, 93-98.

161. LOURIA, D.B. et BRAYTON, R.G.
A substance in blood lethal for Candida albicans.
Nature, 1964, 201, 309.

162. LUDEWIG, R.
Tierexperimentelle methode zur prufung von antimykotika.
Z. Haut-Geschl. Krkh, 1968, 43, 635-638.

163. LUTZ, A., GROTTEN, O. et WITZ, M.A.
Etude sur des champignons levuriformes du genre Candida, leur fréquence, l'action de la mycostatine et de la trichomycine.
Rev. Immunol., 1957, 21, 237-259.

164. LYR, H.
On the toxicity of oxidized polyphenols.
Phytophatol. Z., 1965, 52, 229-240.

165. MAIBACH, H.I. et KLIGMAN, A.M.
The biology of experimental human cutaneous moniliasis (Candida albicans).
Arch. Dermatol., 1962, 85, 233-254.

166. AMLMSTROM, B.G. et RYDEN, L.
The copper-containing oxidases.
in : Biological oxidations.
Singer, T.P., édit., London, Interscience, 1968, 415-438.

167. MANDEL, M., HOOD, F. et COHEN, J.R.
On the apparent stimulation of Candida albicans by chlortetracycline.
Antibiot. Chemo., 1958, 9, 187-191.

168. MANIL, P.
Inhibition de virus phytopathogènes par des extraits de plantes.
C.R. Soc. Biol., 1949, 143, 101-105.

169. MANIL, P.
Observations sur les conditions de l'inhibition de virus par des extraits végétaux.
C.R. Soc. Biol., 1949, 143, 105-108.

170. MARPLESS, M.J. et DI MENNA, M.E.
The incidence of Candida albicans in Dudedin, New Zealand.
J. Path. Bact., 1952, 64, 479-502.

171. MARCELOU, U. et SEGRETAIN, G.
Action des antibiotiques "in vitro" sur la croissance des Candida.
Ann. Inst. Pasteur, Paris, 1954, 87, 229-233.

172. MASON, H.S.
Comparative biochemistry of the phenolase complex.
Adv. Enzymol., 1955, 16, 105-184.

173. MASON, H.S., SPENCER, E. et YAMAZAKI, I.
Identification by electron spin resonance spectroscopy of the primary product of tyrosinase-catalysed catechol oxidation.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 1961, 4, 236-238.

174. MASQUELIER, J.
Recherches sur les pigments de la graine d'arachide (Arachis hypogaea).
Thèse doct. Science (Etat), Bordeaux, 1948.

175. MASQUELIER, J.
Action comparée de divers facteurs vitaminiques P sur l'acide ascorbique-oxydase.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1951, 33, 304-305.

176. MASQUELIER, J.
Identification et dosage des facteurs vitaminiques P dans diverses boissons fermentées.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1956, 38, 65-70.

177. MASQUELIER, J.
Leucoanthocyannes ou leucotannoïdes ?
Volume commémoratif de centenaire de L.Braemer,1958, 109-117.

178. MASQUELIER, J.
Sur quelques propriétés biologiques des anthocyanes et des leucoanthocyanes de la vigne (Vitis vinifera)
Qualitas Plantarum et Materiae Vegetabiles, 1958, 3/4, 481-490.

179. MASQUELIER, J.
The bactericidal action of certain phenolics of grapes and wines.
in : The pharmacology of plant phenolics.
Fairbairn, J.W., édit., London, Academic Press, 1959, 123-131.

180. MASQUELIER, J.
Les ferments lactiques lyophilisés, adjuvants indispensables de l'antibiothérapie.
J. Méd. Bordeaux, 1959, 136, 375-378.

181. MASQUELIER, J.
Action préventive des ferments lactiques sur les affections fongiques provoquées par l'antibiothérapie.
J. Méd. Bordeaux, 1959, 136, 491-493.

182. MASQUELIER, J.
Dosage des leucoanthocyannes du vin blanc. Emploi de la poudre de polyamide.
Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 1963, 102, 51-52.

183. MASQUELIER, J.
Le vin dans l'alimentation.
Bull. Soc. Hyg. Alimen., 1965, 53, 261-270.

184. MASQUELIER, J.
Les antibiotiques naturels des aliments.
Bibl. Nutritio et Dieta, 1968, 10, 159-175 (Krager, Basel/New-York).

185. MASQUELIER, J.
Travaux non publiés, 1968.

186. MASQUELIER, J. et BEUSTES, J.
Prévention de la moniliase intestinale secondaire à l'antibiothérapie. Etude expérimentale chez le cobaye.
Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 1958, 97, 18-22.

187. MASQUELIER, J.,CLAVEAU,P. et GOLSE, J.
Métabolisme du leucocyanidol chez le rat.
Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 1966, 104, 193-199.

188. MASQUELIER, J. et GOLSE, J.
Présence du complexe leucocyanidol-catéchine de Forsyth dans le chocolat.
Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 1961, 100, 241-247.

189. MASQUELIER, J. et GRENIER, D.
Effet du leucocyanidol sur le catabolisme auxinique.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1967, 49, 1807-1812.

190. MASQUELIER, J. et JENSEN, H.
Recherches sur l'activité bactéricide des vins rouges.
Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 1953, 91, 24-29.

191. MASQUELIER, J. et JENSEN, H.
Recherches sur l'activité bactéricide des vins rouges.
Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 1953, 91, 105-109.

192. MASQUELIER, J. et MICHAUD, J.
Etat des leucoanthocyannes dans le rhytidome de Pinus maritima Lamk.
Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 1965, 104, 33-36.

193. MASQUELIER, J., PATAY, R., DANON, G. et BERNARD, J.P.
A propos de l'action vasoconstrictive et particulièrement coronaro-constrictive d'un tannoïde du vin.
Bull. Acad. Méd., 1960, 144, 716-721.

194. MASQUELIER, J. et POINT, G.
Les substances vitaminiques P des vins blancs. Extraction et dosage.
Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 1955, 94, 80-84.

195. MASQUELIER, J. et POINT, G.
Le leucoanthocyane des cépages blancs de Vitis vinifera.
Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 1956, 95, 6-11.

196. MASQUELIER, J. et ROUX, J.
Sur la stabilité des leucoanthocyannes dans les médicaments galéniques.
Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 1960, 99, 65-72.

197. MASQUELIER, J. et SANSOUS, G.
Un nouveau facteur vitaminique P isolé du pin des Landes.
Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 1953, 91, 16.

198. McGOVERN, J.J., PARROTT, R.H., EMMONS, C.W., ROSS, S., BURKE, F.G. et RICE, E.C.
The effect of Aureomycin and chloramphenicol on the fungal and bacterial flora of children.
New-England J. Med., 1953, 248, 397.

199. MICHAUD, J.
Modification de la réaction au ferricyanure ferrique (Barton) pour la détection sur chromatogramme des polyphénols réducteurs.
Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 1966, 105, 15-19.

200. MICHAUD, J.
Communication personnelle, 1969.

201. MICHAUD, J. et MASQUELIER, J.
Synthèse du leucocyanidol monomère.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1968, 50, 1346-1348.

202. MILISAVLJEVIC, D.
Action postfermentaire des levures sur les composés phénoliques du vin.
in : Fermentations et vinifications.
Institut National de la recherche agronomique, Paris, 1968, 1, 309-323.

203. MORAWIECKI, A.
The reaction of tannin with polyamino acids.
Arch. Immunol. Therap. Exper., 1963, 11, 139-171.

204. MORRIS, E.O.
Yeast growth.
in : The chemistry and biology of yeasts.
Cook, A.H., édit., London, Academic Press, 1958,251.

205. MOURAD, S. et FRIEDMAN, L.
Pathogenicity of Candida.
J. Bact., 1961, 81, 550-556.

206. MOURAD, S. et FRIEDMAN, L.
Active immunisation of mice against Candida albicans.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 1961, 106, 570-572.

207. MUNOZ, J. et GEISTER, R.
Inhibition of phagocytosis by aureomycin.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 1950, 75, 367-370.

208. NAGHSKI, J., COPLEY, M.J. et COUCH, J.F.
The antibacterial action of flavonols.
J. Bact., 1947, 54, 34.

209. NOVAK, E.K.
Provocation of systemic mycoses by therapeutic agents.
Fifth international congr. chemotherapy, Vienne, 1967, 85-88.

210. OKU, H.
Biochemical studies on Cochliobolus miyabeanus. IV. Gungicidal action of polyphenols and the role of polyphenoloxidase of the fungus.
Phytopathol. Z., 1960, 38, 342-354.

211. ORTEGA, M.
Recherches sur les leucoanthocyannes des vins rouges.
Thèse doct. Pharmacie (Univ.), Bordeaux, 1959.

212. OWENS, R.G.
Chemistry and physiology of fungicidal action.
Annu. Rev. Phytopath., 1963, 1, 77-100.

213. PAINE, T.F.
The inhibitory actions of bacteria on Candida growth.
Antibiot. Chemo., 1958, 8, 273-281.

214. PAPPENFORT, R.B. et SCHNALL, E.S.
Moniliasis in patients treated with aureomycin.
Arch. Int. Med., 1951, 88, 729-735.

215. PATAY, R., MASQUELIER, J., DANON, G., BERNARD, J.-P. et PATAY, M.
A propos de l'action d'un tannoïde du vin.
Bull. Acad. Méd., 1961, 145, 322-325.

216. PAVLATOU, M. et MARCELOU, U.
Milieu favorisant la formation de chlamydospores de Candida albicans.
Ann. Inst. Pasteur, Paris, 1956, 91, 410.

217. PERCEBOIS, G. et MONGE, C.
Valeur de l'épreuve de filamentation en sérum pour le diagnostic rapide de Candida albicans.
Ann. Biol. Clin., 1966, 24, 973-977.

218. PERI; C.
Action des leucoanthocyanes sur l'activité et la viabilité des levures.
in : Fermentations et vinifications.
Institut national de la recherche agronomique,Paris, 1968, 1, 325-329.

219. PIERPOINT, W.S.
The enzymic oxidation of chlorogenic acid and some reactions of the quinone produced.
Biochem. J., 1966, 98, 567-580.

220. PIERPOINT, W.S.
o-Quinones formed in plant extracts. Their reactions with amino acids and peptides.
Biochem. J., 1969, 112, 609-616.

221. PIERPOINT, W.S.
o-Quinones formed in plants extracts. Their reactions with bovine serum albumin.
Biochem. J., 1969, 112, 619-629.

222. PIERPOINT, W.S. et HARRISON, B.D.
Copper-dependent and iron-dependent inactivations of cucumber mosaic virus by polyphenols.
J. Gen. Microbiol., 1963, 32, 429-440.

223. POLLARD, A., KIESER, M.E. et SISSONS, D.J.
Inactivation of pectic enzymes by fruit phenolics.
Chem. Ind., 1958, 952.

224. PORTER, P.S. et LYLE, J.S.
Yeast vulvovaginitis due to oral contraceptives.
Arch. Dermatol., 1966, 93, 402.

225. PORTER, W.L. et SCHWARTZ, J.H.
Isolation and description of the pectinase-inhibiting tannins of grape leaves.
J. Food Sci., 1962, 27, 416-418.

226. PUGH, C.E.M. et RAPER, H.S.
The action of tyrosinase on phenols.
Biochem. J., 1927, 21, 1370-1383.

227. RAMASWAMY, A.S., RAO, K.H. et SRISI, M.
Present status of natural flavonoids in health and disease.
Pharmaceutist (Indes), 1966, 12, 12-15.

228. RANGASWAMI, S. et VENKATESWARLU, P.
Polyphenols from the stem bark of Rhododendron grande Wight.
Proc. Indian Acad. Sci. A, 1966, 64, 185-191.

229. REISS, F. et SZILAGYI, G.
Chlamydospore formation of Candida albicans. Comparative studies on special media.
Dermatologica, 1965, 131, 315-324.

230. RIBEREAU-GAYON, P. et STONESTREET, E.
Dosage des tannins du vin rouge et détermination de leur structure.
Chim. Anal., 1966, 48, 188-196.

231. RICH, S. et HORSFALL, J.G.
Relation of polyphenol oxidase to fungitoxicity.
Proc. Nat. Acad. Sci., 1954, 40, 139-145.

232. RIMBAUD, P., HARANT, H., RIOUX, J.A. et CARON, G.
Etude du pouvoir antifongique de la dichloroxyquinaldine. Essai thérapeutique dans la candidose digestive expérimentale.
Sem. Hôp. Path. Biol., 1957, 33, 1291.

233. ROBERTS, E.A.H.
The chemistry of tea fermentation.
J. Sci. Food Agric., 1952, 3, 193-198.

234. ROBERTS, E.A.H.
Economic importance of flavonoid substances : Tea fermentation.
in : The chemistry of flavonoid compounds.
Geissman, T.A., édit., 1962, 468-512.

235. ROBERTS, E.A.H. et WOOD, D.J.
A study of the polyphenols in tea leaf by paper chromatography.
Biochem. J., 1951, 49, 414-422.

236. ROTH, F.J. et EYLAR, O.R.
A selective enhancement by aureomycin of the pathogenicity of Candida albicans for mice.
Bacteriol. Proc., 1954, 87.

237. ROUX, D.G.
Biogenesis of condensed tannins from leucoanthocyanins.
Nature, 1958, 181, 1454-1456.

238. ROUX, D.G. et MAIHS, A.E.
Selective spray reagents for the identification and estimation of flavonoid compounds associated with condensed tannins.
J. Chromato., 1960, 4, 65-74.

239. ROUX, J.
Recherches sur la stabilité des leucoanthocyannes dans les médicaments galéniques.
Thèse doct. Pharm. (Univ.), Bordeaux, 1959.

240. RUBBO, S.D., ALBERT, A. et GIBSON, M.I.
The antibacterial activity of 8-hydroxyquinoline (oxine).
Brit. J. Exptl. Pathol., 1950, 31, 425-441.

241. SALLE, A.J.
Fundamental principles of bacteriology, New-York, McGrax-Hill, 1967, 822 p.

242. SASTRY, G.P., BARUAH, J.N. et RAO, P.R.
(-) epigallocatechin from Acacia arabica bark.
Indian J. Chem., 1963, 1, 542-543.

243. SCHAAL, L.A. et JOHNSON, G.
The inhibitory effect of phenolic compounds on the growth of Streptomyces scabies as related to the mechanism of scab resistance.
Phytopathology, 1955, 45, 626-628.

244. SCHABERG, A., HILDES, J.A. et WILT, J.C.
Disseminated candidiasis.
Arch. Int. Med.,1955, 95, 112-117.

245. SEELIG, M.S.
Mechanisms by which antibiotics increase the incidence and severity of candidiasis and alter the immunological defenses.
Bact. Rev., 1966, 30, 442-459.

246. SEELIG, M.S.
The role of antibiotics in the pathogenesis of Candida infections.
Amer. J. Med., 1966, 40, 887-917.

247. SEGRETAIN, G., DROUHET, E. et MARIAT, F.
Diagnostic de laboratoire en mycologie médicale.
Editions de la Tourelle, St-Mandé, 1964, 162 p.

248. SELIGMAN, E.
Virulence enhancing activities of aureomycin on Candida albicans.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 1952, 79, 481-484.

249. SELIGMAN, E.
Virulence enhancement of Candida albicans by antibiotics and cortisone.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 1953, 83, 778-781.

250. SENO, T.
Copper permeability of yeast in relation to copper resistance.
Mem. Coll. Sci. Univer. Kyoto, B, 1963, 30, 9-20.

251. SESHADRI, T.R.
Present knowledge of the chemistry of proanthocyanidins.
J. Indian Chem. Soc., 1967, 44, 628-636.

252. SHARP, J.L.
The growth of Candida albicans during antibiotic therapy.
Lancet, 1954, 1, 390-392.

253. SHULMAN, A. et DWYER, F.P.
Metal chelates in biological systems.
in : Chelating agents and metal chelates.
Dwyer, F.P. et Mellor, D.P., édit., New-York, Academic Press, 1964, 383.

254. SIEGLE, H.
Microbiological and biochemical aspects of heartwood stain in Betula papyrifera Marsh.
Can. J. Bot., 1967, 45, 147-154.

255. SINGER, T.P.
Biological oxidations.
Interscience, London, 1968.

256. SKINNER, C.E. et FLETCHER, D.W.
A review of the genus Candida.
Bact. Rev., 1960, 24, 397-416.

257. SOMAATMADJA, D., POWERS, J.J. et WHEELER, R.
Action of leucoanthocyanins of cabernet grapes on reproduction and respiration of certain bacteria.
Amer. J. Enol. Viticult., 1965, 16, 54-61.

258. SOMERS, E.
The fungitoxicity of metal ions.
Ann. Appl. Biol., 1961, 49, 246-253.

259. SOMERS, E.
The uptake of copper by fungal cells.
Ann. Appl. Biol., 1963, 51, 425-437.

260. SONNENSCHEIN, H., CLARK, H.L. et TASCHDJIAN, C.L.
Congenital cutaneous candidiasis in a premature infant.
J. Dis. Child., 1960, 99, 81-85.

261. STEIN, E.
Comparison of chlamydospore production on new mediums.
Am. J. Clin. Pathol., 1956, 26, 1231.

262. STERNBERG, T.H., TARBET, J.E., NEWCOMER, V.D., HUDDLESON, H.G., WEIR, R.H., WRIGHT, E.T. et EGEBERG, R.O.
Antifungal effects of nystatin on the fecal flora of animals and man.
Antibiot. Annu., 1953-54, 199-209.

263. STOCKER, H.R.
Zur chemie der flavanoidgerbstoffe.
Schweizer Brauerei-Rundschau, 1967, 78, 33.

264. STORMONT, R.T.
Warning statement to be included in Aureomycin hydrochloride, chloramphenicol and Terramycin hydrochloride labeling.
J. Am. Med. Assoc., 1951, 145, 1267.

265. SVOBODOVA, Y. et DROBNICA, L.
Study of physiological and biochemical properties of Candida albicans strains causing various diseases.
Folia Microbiol., 1962, 7, 312-319.

266. SWAIN, T.
Some interrelationships between leuco-anthocyanins and lignin in plants.
in : Phenolics in plants in health and disease.
Pridham, J.B., édit., Oxford, Pergamon Press, 1960, 45-55.

267. SWAIN, T.
The tannins.
in : Plant biochemistry.
Bonner, J. et Varner, J.E., édit., New-York, Academic Press, 1965, 552-580.

268. SWAIN, T. et BATE-SMITH, E.C.
Leuco-anthocyanins.
in : The chemistry of vegetable tannins.
Symp. Soc. Leather Tr. Chem., Croydon, 1956,109-120.

269. SWARDT, G.H., MAXIE, E.C. et SINGLETON, V.L.
Some relationships between enzyme activities and phenolic components in banana fruit tissues.
S. Afr. J. Agric. Sci., 1967, 10, 641-649.

270. SZECHENYI, L.
Formation des complexes métalliques des anthocyanes dans les jus de fruits et leur influence sur la couleur.
Industr. Alimen. Agric., 1964, 81, 309-317.

271. TAKINO, Y., IMAGAWA, H., AOKI, Y. et OZAWA, T.
Studies on the mechanism of the oxidation of tea leaf catechins.
Agr. Biol. Chem. (Japon), 1963, 27, 562-568.

272. TASCHDJIAN, C.L., BURCHALL, J.J. et KOZINN, P.J.
Rapid identification of Candida albicans by filamentation on serum and serum substitutes.
J. Dis. Child., 1960, 99, 212-215.

273. TAYEAU, F. et MASQUELIER, J.
Localisation de l'arachidoside dans la graine d'arachide.
Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 1947, 85, 7.

274. TAYEAU, F. et MASQUELIER, J.
Etude chimique sur les pigments de la graine d'arachide. I. Le chromogène.
Bull. Soc. Chim. (France), 1948, 15, 1167-1172.

275. TAYEAU, F. et MASQUELIER, J.
Les pigments de la graine d'arachide. I. Le chromogène. Constitution chimique. Propriétés physiologiques.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1949, 31, 72-75.

276. TAYEAU, F., MASQUELIER, J. et LEFEVRE, G.
Dosage du leucoanthocyanidol de l'arachide.
Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 1951, 89, 5-10.

277. TAYEAU, F., NIVET, R., MARQUEVIELLE, J. et DUMAS,M.
Action du leucocyanidol sur le sérum sanguin "in vitro".
Bull. Soc. Chim. Biol., 1958, 40, 671-682.

278. TIMBERLAKE, C.F.
Metallic components of fruit juices. II. The nature of some copper complexes in apple juice.
J. Sci. Food Agric., 1957, 8, 159-168.

279. TOMIYAMA, K.
Physiology and biochemistry of disease resistance of plants.
Ann. Rev. Phytopath., 1963, 1, 295-324.

280. URITANI, I.
The biochemical basis of disease resistance induced by infection.
Conn. Agric. Exp. Sta. Bull., 1963, n°663, 4-19.

281. VANBREUSEGHEM, R.
Guide pratique de mycologie médicale et vétérinaire.
Masson et Cie, Paris, 1966.

282. VERCAUTEREN, R. et MASSART, L.
Model oxygenases and theorical consideration on the activation of oxygen.
in : Oxygenases.
Hayaishi, O., édit., New-York, Academic Press, 1962, 355-407.

283. VIC-DUPONT, V., COULAUD, J.-P. et DELRIEU, F.
Les septicémies à "Candida".
Presse Méd., 1968, 76, 747-750.

284. WALKER, J.R.L.
Studies on the enzymic browning of apples. II. Properties of apple polyphenoloxidase.
Aust. J. Biol. Sci., 1964, 17, 360-371.

285. WALKER, J.R.L. et REDDISH, C.E.S.
Note on the use of cysteine to prevent browning in apple products.
J. Sci. Food Agric., 1964, 15, 902-904.

286. WEINBERG, E.
The reversal of the toxicity of oxytetracycline (Terramycin) by multivalent cations.
J. Inf. Dis., 1954, 95, 291-301.

287. WEINBERG, E.D.
The inclusion of tetracycline-reversing substances in mediums for primary isolations.
Am. J. Clin. Path., 1956, 26, 1234.

288. WEINBERG, E.D.
The mutual effects of antimicrobial compounds and metallic cations.
Bact. Rev., 1957, 21, 46-68.

289. WEINBERG, E.D.
The relationship of metal-vinding to antimicrobial action.
in : Metal-binding in medicine.
Seven, M.J., édit., Philadelphia, Lippincott, 1960, 329-334.

290. WEINBERG, E.D.
Known and suspected role of metal coordination in actions of antimicrobial drugs.
Feder. Proc. (U.S.A.), 1961, 20, 132-136.

291. WEISSBERGER, A. et LUVALLE, J.E.
The autoxidation of ascorbic acid in the presence of copper.
J. Amer. Chem. Soc., 1944, 66, 700-705.

292. WESSLER, S. et BROWNE, H.R.
Candida albicans (Monilia albicans) infection with blood stream invasion ; report of a case with a strain clinically resistant to sulfonamide drugs and to penicillin in vitro.
Ann. Int. Med., 1945, 22, 886.

293. WHALLEY, W.B.
The stereochemistry of the chromans and related compounds.
in : The chemistry of vegetable tannins.
Symp. Soc. Leather Tr. Chem., Croydon, 1956, 151-160.

294. WHALLEY, W.B.
The stereochemistry of flavonoid compounds.
in : The chemistry of flavonoid compounds.
Geissman, T.A., édit., Oxford, Pergamon Press,1962,
441-467.

295. WHITE, T.
Tannins. Their occurance and significance.
J. Sci. Food Agric., 8, 377-385.

296. WILLIAMS, A.H.
The distribution of phenolic compounds in apple and
pear trees.
in : Phenolics in plants in health and disease.
Pridham, J.B., édit., 1960, Oxford, Pergamon Press,
1960, 3-7.

297. WILLIAMS, A.H.
Enzyme inhibition by phenolic compounds.
in : Enzyme chemistry of phenolic compounds.
Pridham, J.B., édit., 1963, Oxford, Pergamon Press,
1963, 87-95.

298. WINDER, F.
Metal ions and isoniazid action.
Amer. Rev. Resp. Dis., 1962, 85, 925-926.

299. WOOD, R.K.S. et COLE, M.
The degradation of pectic substances by plant pathogens.
Chem. Ind., 1958, 433.

300. WOODS, J.W., MANNING,I.H. et PATTERSON, C.N.
Monilial infection complicating the therapeutic use
of antibiotics.
J.A.M.A., 1951, 145, 207-211.

301. YOUNG, G.
The process of invasion and the persistance of Candi-
da albicans injected intraperitoneally into mice.
J. Infect. Dis., 1958, 102, 114-120.

302. YOUNG,G., KRASNER,R.I. et YUDKOFSKI,P.L.
Interactions of oral strains of Candida albicans and
lactobacilli.
J. Bact., 1956, 72, 525-529.

303. ZIMMERMAN, L.E.
Candida and *Aspergillus* endocarditis with comments on the role of antibiotics in dissemination of fungus diseases.
Arch. Path., 1950, 50, 591.

Editions BERGERET-2,rue Bergeret-Bordeaux-Tél.91.12.59

TABLE DES MATIERES

Pages

INTRODUCTION 1

PREMIERE PARTIE - GENERALITES 5

CHAPITRE I - LES CANDIDOSES 7

A/ Le renouveau des infections fongiques. Rôle de la thérapeutique moderne 7

1° - Introduction 7
2° - Antibiothérapie 8
3° - Hormonothérapie 11
a) Corticostéroïdes 11
b) Contraceptifs 12

B/ Mécanismes par lesquels les antibiotiques augmentent les infections fongiques 12

1° - Action directe 12
2° - Action sur la flore 15
a) Actions de différentes bactéries sur la croissance de C. albicans 15
b) Effets des antibiotiques sur la flore 18
3° - Altération des mécanismes de défense 20
a) Observations de phénomènes de défense contre C. albicans 21
b) Altération de ces phénomènes par les antibiotiques 23

C/ Conclusions 24

Pages

CHAPITRE II - LES LEUCOANTHOCYANNES 27

A / Définition 27

B / Structure 29

1° - Preuves chimiques 29
2° - Synthèse 29
3° - Stéréoisomérie 32

C / Propriétés chimiques 33

1° - Transformation en anthocyannes 33
2° - Polymérisation 35
a) Catalyse acide 35
b) Condensation par oxydation 39
1 - Autooxydation 40
α - Etude spectrale 40
β - Réaction à la vanilline 42
γ - Produits de dégradation 42
2 - Oxydation enzymatique 44
α - Les tyrosinases 44
β - Les laccases 45
γ - Les peroxydases 46

D / Actions pharmacologiques 47

1° - Résistance capillaire 47
2° - Inhibition enzymatique 49
3° - Activité virale 51
4° - Activité antibiotique 52

E / Propriétés physiques 53

1° - Description du produit d'extraction 53
2° - Solubilités 53
3° - Propriétés spectrales 54

Pages

DEUXIEME PARTIE - RECHERCHES EXPERIMENTALES 57

CHAPITRE III - Essais sur l'activité levuricide de différents mélanges leucocyanidol + cuivre 59

A / Identification des souches de Candida albicans utilisées 59

1° - Filamentation 59
- Protocole 60
- Résultats .....
2° - Zymogramme 60
- Protocole 61
- Résultats 62
3° - Auxanogramme 62
- Protocole 63
- Résultats 63
4° - Chlamydospores 63
- Protocole 64
1- Milieu P. C. B. 64
2- Gélose au riz + tween 80 64

B / Milieu d'étude 65

C / Produits utilisés 66

1° - Cuivre 66
2° - Leucocyanidol 66

D / Essais photométriques préliminaires 67

1° - Leucocyanidol 67
2° - Leucocyanidol + cuivre 68

E / Numération des survivants 68
- Protocole 68
- Résultats 69

Pages

CHAPITRE IV - MECANISME D'ACTION 73

A / Chélation - Etude chromatographique 73
- Protocole 73
- Résultats 73

B / Adsorption du leucocyanidol en surface . Diminution de la concentration léthale du cuivre 74

1° - Essais préliminaires avec des hématies de mouton 74
- Protocole 74
- Résultats 75
- Commentaires 75
2° - Action du leucocyanidol sur C. albicans 76
3° - Action du gallate de propyle 77
4° - Remplacement du cuivre par un autre métal 78

C / Oxydation du leucocyanidol par le cuivre . ..... Production de composés toxiques 79

1° - Introduction 79
2° - Produits bruns 83
- Protocole 84
- Résultats .....
3° - Temps nécessaire à l'action antibiotique en YNBM 85
- Protocole 85
- Résultats 85
4° - Essais en milieu aqueux 86
a) Transformation du leucocyanidol par le cuivre : preuve spectrale 86
- Protocole 87
- Résultats 87
b) Influence du cuivre sur la fixation du leucocyanidol en surface 88
- Protocole 89
- Commentaires 89

Pages

5° - Influence du pH 90
a) Essais en tampon phosphate (7 mM) 91
- Protocole 91
- Résultats 91
b) Essais en tampon phtalate 93
6° - Temps de contact et activité 94
- Protocole 94
- Résultats 95
7° - Polymérisation du leucocyanidol par le cuivre. Preuve chromatographique..... 96
- Protocole 96
- Résultats 97
8° - Nature des composés intermédiaires 97
a) Réaction avec l'aniline 97
- Protocole 100
- Résultats 100
- Commentaires 101
b) Réaction avec les acides aminés 102
c) Réaction avec la cystéine 103
9° - Extraction du cuivre 103
- Protocole 104
a) Essai antibiotique 104
b) Procédé d'extraction du cuivre 104
- Résultats 105
10° - Oxydation enzymatique 107
- Protocole 107
a) Préparation enzymatique 107
b) Essai antibiotique 107
- Résultats 107
- Commentaires 107
11° - Catalyse cuivrique . Tentative d'explication 108
a) Introduction 108
b) Dégagement d'ions hydrogène 113
- Protocole 113
- Résultats 114
- Commentaires 114
c) Etude spectrale 114

D / Conclusions 115

Pages

CHAPITRE V - APPLICATIONS PRATIQUES 117

A / Activité "per os" 117

1° - Sur la levure saprophyte de la souris 117
a) Essai "in vitro" 117
- Protocole 117
- Résultats 118
b) Essai "in vivo" 118
- Protocole 118
- Résultats 119

2° - Sur l'infestation intestinale de la souris par Candida albicans 120
- Protocole 121
a) Infestation et administration du mélange 121
b) Recueil des selles 121
c) Nutrition 122
- Résultats 122

B / Activité locale 124

- Protocole 124
- Résultats et conclusion 125

CONCLUSIONS GENERALES 127

BIBLIOGRAPHIE 129

EDITIONS BERGERET - 2, rue Bergeret - BORDEAUX - Tél.91.12.59